29-2

N° d'ordre : 235

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Michel LABADIE

DOCTEUR EN MÉDECINE — CHEF DE TRAVAUX

1re Thèse — Recherches sur l'évolution pré-biologique : Le cyanure d'ammonium et les acides azulmiques.

2e Thèse — Les hormones à noyau indole.

Soutenues le 3 octobre 1968, devant la Commission d'Examen :

MM. P. CRÉAC'H, Professeur ..... *Président.*

J. SÉCHET, Professeur .....
J. BARAUD, Professeur .....
E. NEUZIL, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux ..... } *Examinateurs.*

— 1968 —

N° d'ordre : 235

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Michel LABADIE

DOCTEUR EN MÉDECINE — CHEF DE TRAVAUX

1re Thèse — Recherches sur l'évolution pré-biologique : Le cyanure d'ammonium et les acides azulmiques.

2e Thèse — Les hormones à noyau indole.

Soutenues le 3 octobre 1968, devant la Commission d'Examen :

MM. P. CRÉAC'H, Professeur ..... *Président.*

J. SÉCHET, Professeur .....
J. BARAUD, Professeur .....
E. NEUZIL, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux ..... } *Examinateurs.*

— 1968 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

MM.

Doyen honoraire... BRUS.

Doyen..... CALAS.

MM.

Professeurs honoraires..

KASTLER ..... Professeur à la Sorbonne.
PISOT ..... Professeur à la Sorbonne.
M[lle] JOSIEN..... Professeur à la Sorbonne.
MILLOUX.
DANGEARD.
CAU.
GENEVOIS.

Professeurs.....

BRUS..... Chimie.
AVEL..... Zoologie et Physiologie animale.
ROUSSET..... Physique générale.
ROGER..... Mécanique rationnelle.
WEILL..... Anatomie comparée et Embryogénie.
DUFRESNOY..... Mathématiques générales.
LAFON..... Physiologie générale.
BOUNHIOL..... Biologie animale.
SERVANT..... Physique.
CALAS..... Chimie organique.
GAY..... Cristallographie et minéralogie.
PACAULT..... Chimie physique.
SCHOELLER..... Géologie.
DAVID..... Physiologie végétale.
COLMEZ..... Méthodes mathématiques de la Physique.
CAMBAR..... Biologie animale.
VIGNEAUX..... Géologie.
PANOUSE..... Zoologie (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc).
ARZELIES..... Physique (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc).
RIBEREAU-GAYON Œnologie et Chimie agricole.
RISS..... Mathématiques.
GUIZONNIER..... Physique.
HAGET ..... Zoologie expérimentale.
SÉMIROT..... Astronomie.
CHASTEL ..... Physique nucléaire.
HAGENMULLER... Chimie minérale.
CRÉAC'H..... Biologie animale.
LOUDETTE ..... Mécanique physique.
PATY..... Chimie.
BORDES ..... Préhistoire.
SÉCHET..... Botanique.
BAGANAS..... Mathématiques.
VALENTIN..... Radio-Electricité.
LAFARGUE..... Physique (C. S. U. de Pau).
ENNOUCHI..... Géologie (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc).
EYMÉ..... Botanique.
RUAMPS..... Physique électronique.
DESCHAMPS..... Chimie (C. S. U. de Pau).
FRAINNET..... Chimie organique.

Professeurs

HOARAU ..... Chimie Physique.
MARCHAND ..... Chimie.
LALANDE ..... Chimie Appliquée.
GOTTIS..... Géologie dynamique.
LEMANCEAU..... Chimie.
CARDO..... Psychophysiologie.
ROCH..... Physique.
BELLON..... Chimie (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc).
CLASTRE..... Cristallographie physique.
JOUSSOT-DUBIEN. Chimie.
VALADE..... Chimie organique.
SURDIN ..... Automatique.
BLONDEL..... Mathématiques.
SOURISSEAU .... Chimie.
MAYER..... Physique (C. S. U. de Pau).
Mlle FAURE-MURET Géologie (détachée à la Faculté des Sciences du Maroc).
CLIN..... Géologie.
LOCHET..... Physique.
VINDT..... Biologie végétale.
RÉGNIER..... Mathématiques.
Mlle LAFFITTE.. Physique.
DESTRIAU..... Chimie.
PETIT..... Physique corpusculaire.
BARAUD..... Chimie biologique.
EMBERGER..... Géologie.
BOTHOREL..... Chimie.
CHARRU..... Physique.
SIMONOFF..... Chimie physique.
LASCOMBE..... Chimie.
RIMPAULT..... Physique théorique.
BONASTRE..... Chimie (C. S. U. de Pau).
BARETS..... Biologie animale.
GROMB..... Chimie (C. S. U. de Pau).
PINEAU..... Chimie.
LÉVÊQUE..... Géologie approfondie.
BOUSSEAU..... Physique.
MENNRATH ..... Physique.
ANDRÉ..... Biologie générale.
BOUAS-LAURENT. Chimie organique.
N ..... Biochimie.
N ..... Informatique.
N..... Calcul infinitésimal.

Maître de conférences honoraire. DE PUYMALY

Maîtres de conférences

RIBÉREAU-GAYON P. .. Chimie œnologie.
DUPUY..... Physique (C. S. U. de Pau)
LACAZE ..... Physique (C. S. U. de Pau).
Mlle DUTRIEU... Physiologie animale.
RAULT..... Chimie minérale.
Mme PETIT..... Physique.
BERNET ..... Génétique.
GOMEL .....Chimie (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc).
BABIN ..... Physique (C. S. U. de Pau).
FRESNEL ..... Mathématiques.
MOYES ..... Géologie.
LUTZ ..... Botanique.
MOULINES ..... Chimie
METRAS ..... Chimie (C. S. U. de Pau).
POUCHARD ..... Chimie minérale.
SARDOS ..... Physique
MATTENET..... Mathématiques (C. S. U. de Pau).
LESCA ..... Mathématiques.
ARTOLA ..... Mathématiques.
DUMERY ..... Mécanique.
DE MAHTAN .... Mathématiques.
BECKER ..... Mathématiques.
N ..... Physique (C. S. U. de Pau).
N ..... Physique théorique.
N ..... Physique théorique.
N ..... Mathématiques (C. S. U. de Pau).

Conseiller administratif. M. LLORENS.

RECHERCHES SUR L'EVOLUTION PRE-BIOLOGIQUE : LE CYANURE D'AMMONIUM ET LES ACIDES AZULMIQUES.

AVANT-PROPOS

Recréer au laboratoire les étapes de la naissance des êtres vivants à partir de la matière non vivante est devenu, depuis quelques années, l'ambition des "alchimistes" modernes.

Nous devons à Monsieur le Professeur NEUZIL notre modeste participation à ce grand dessein.

A l'occasion de la réforme des études médicales, en 1961, Monsieur le Doyen TAYEAU nous a permis de revenir à la Faculté de Médecine de Bordeaux; nous l'assurons de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur NEUZIL a bien voulu alors nous accueillir dans son laboratoire; il nous a initié à la recherche biochimique, nous a inspiré le sujet de ce travail - sujet qui correspond très bien à nos penchants naturels - et nous a offert les possibilités matérielles pour sa réalisation. Nous le prions de trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur BRETON, notre fidèle ami qui nous a toujours apporté son appui bienveillant et ses conseils dans la recherche, nous adressons nos plus vifs remerciements.

Monsieur le Professeur JENSEN a bien voulu nous aider dans la partie analytique de ce travail; qu'il accepte notre gratitude pour l'aide matérielle et les conseils qu'il nous a donnés.

Madame DUCASTAING, assistante et Mademoiselle MELLET, aide-technique, ont été nos dévouées collaboratrices; nous leur adressons nos remerciements les plus cordiaux.

Nous remercions vivement Monsieur le Docteur COHERE, chef de travaux et Madame BRECHENMACHER, assistante grâce à qui nous avons pu effectuer une étude au microscope électronique. A Monsieur le Professeur MAYER qui nous a permis l'accès de son laboratoire, nous exprimons nos remerciements.

Nous remercions sincèrement Monsieur MERLAND, chef de travaux, pour les conseils qu'il nous a amicalement donnés dans les domaines de la chimie analytique et de la chimie minérale.

Nous sommes très touché de l'honneur que nous fait Monsieur le Professeur CREAC'H de présider cette thèse. Qu'il soit assuré de nos sentiments très reconnaissants.

Nous remercions Monsieur le Professeur SECHET et Monsieur le Professeur BARAUD d'avoir bien voulu accepter de faire partie de ce jury.

INTRODUCTION

L'ORIGINE DE LA VIE ET L'EVOLUTION PRE-BIOLOGIQUE.

Depuis vingt cinq siècles au moins, le problème de l'origine de la vie sur la Terre est débattu entre philosophes et auteurs scientifiques(54,58). De nos jours, cette discussion est encore partagée entre deux grandes tendances, selon que l'on pose à priori l'éternité de la vie ou au contraire la possibilité de sa naissance de novo.

La "Panspermie" résume la première attitude: la vie est éternelle et universelle, la matière et la vie ont toujours existé; cependant, la vie ne peut s'accommoder que de conditions de milieu assez étroites, en particulier de température, aussi faut-il admettre que, lorsque les planètes se sont suffisamment refroidies pour être habitables, elles ont dû être colonisées par des semences de vie provenant des espaces interstellaires, par exemple sous forme de spores de bactéries. Cette théorie déjà ébauchée par ANAXAGORE au V ème siècle avant notre ère, a été reprise vers la fin du siècle dernier lorsque PASTEUR eut montré que, la génération spontanée étant impossible, la vie ne peut venir que de la vie. La théorie la plus élaborée a été émise en 1908 par le chimiste ARRHENIUS (4) qui créa le terme "Panspermie" pour désigner la migration des spores d'une planète à l'autre. L'hypothèse d'un ensemencement de la Terre a été renforcée depuis quelques années par les découvertes faites sur les météorites carbonacées: en effet ces météorites contiennent des composés carbonés d'intérêt biologique(14,47) et des inclusions de taille microscopique qui, d'après CLAUS et NAGY (17), représenteraient des microorganismes ou des spores fossiles. Depuis ces découvertes, une vive controverse est engagée; nous rapporterons en effet que les substances biologiques peuvent avoir une origine abiogène; d'autre part, il est possible que ces

substances,ainsi que les inclusions observées par NAGY et CLAUS aient été apportées au sein des météorites par des contaminations d'origine terrestre(85).De mises au point récentes(91,128),il ressort que les météorites carbonacées ne peuvent encore apporter aucune preuve formelle de la validité de la théorie de la Panspermie.

Diamétralement opposée à cette théorie est l'hypothèse fondamentale selon laquelle la matière vivante peut prendre naissance à partir de la matière non vivante.Parmi toutes les croyances religieuses,les mythes se rattachant à la génération spontanée,les conceptions purement philosophiques et les théories plus scientifiques(58),nous ne retiendrons que deux grands groupes de théories qui restent en vigueur sur le plan scientifique:les théories du hasard et les théories évolutionnistes.

Nous rappellerons brièvement que certains auteurs scientifiques modernes (69,2),reprenant les théories mécanistes du XVIII ème et du XIX ème siècle,soutiennent qu'au cours de la très longue période des temps géologiques,au moins une molécule "vivante" primitive a pu apparaître sur la Terre par suite d'une combinaison très peu probable des éléments.Cette molécule aurait été d'emblée douée du pouvoir d'auto-reproduction,propriété considérée comme l'une des plus fondamentales des êtres vivants; à la lumière des découvertes biochimiques récentes on peut admettre que cette molécule originelle devait être de nature protéique ou nucléoprotéique,c'est-à-dire une molécule dont la structure etait déjà très complexe.GUYE(43) a montré par le calcul des probabilités que la formation de tels édifices moléculaires doit être considérée comme un hasard extraordinaire; cependant cette très faible probabilité n'empêche pas DAUVILLIER et DESGUIN (19)ou WALD(140) de penser que la combinaison la plus improbable peut se produire au moins une fois pourvu que la nature dispose d'un temps suffisamment long.Cependant,un grand nombre d'auteurs modernes s'élèvent violemment contre l'hypothèse d'une substance originelle très complexe;en particulier ,KAHANE (52) exprime son opposition en ces termes:"A mon avis,il est vain,et

par principe ,de chercher le modèle des formes élémentaires de vie dans les substances hautement différenciées et dans les organes hautement élaborés tels que nous les observons aujourd'hui,c'est-à-dire sur les formes vivantes résultant de plusieurs milliards d'années d'évolution".

Nous nous attarderons davantage avec les théories évolutionnistes de l'origine de la vie car notre travail s'y rattache directement.A l'opposé des théories du hasard,les théories évolutionnistes considèrent que le passage de la matière inerte à des organismes vivants n'est pas un phénomène fortuit,mais au contraire le résultat d'une longue évolution chimique orientée vers l'acquisition de structures moléculaires de plus en plus ordonnées et complexes.En réalité on peut déjà trouver une ébauche de ces théories chez certains philosophes matérialistes de l'antiquité,en particulier chez EPICURE,puis dans "De natura rerum" de LUCRECE.C'est au cours de la deuxième moitié du XIX ème siècle que SPENCER (126) et ENGELS (23) généralisent la notion d'évolution énoncée par LAMARCK et DARWIN pour les êtres vivants;la théorie évolutionniste généralisée place l'apparition de la vie dans un immense processus évolutif de la matière,depuis les atomes jusqu'au cerveau humain,ce processus débutant par des synthèses de molécules organiques à partir des éléments minéraux, se poursuivant ensuite vers des niveaux d'organisation de plus en plus complexes,la matière acquérant ainsi progressivement les caractères de la vie et accèdant enfin à l'évolution biologique proprement dite.Il faut donc souligner que,d'après cette théorie, les molécules organiques seraient apparues sur la Terre primitive bien avant les êtres vivants,une évolution chimique moléculaire pré-biologique ayant précédé l'évolution des formes vivantes révélées par la paléontologie.Ces conceptions purement philosiphiques ont été ensuite reprises et précisées par les biologistes;les théories les plus fécondes ont été élaborées dès 1922 par OPARIN(88-90) et HALDANE(44)à partir de 1929.Les théories d'OPARIN et HALDANE,que nous avons exposées dans une publication récente(58),proposent une biogénèse en quatre étapes principales.

1.Synthèse abiotique de composés organiques.

L'atmosphère terrestre primitive,principalement composée de méthane,d'ammoniac,d'hydrogène et de vapeur d'eau,ne comportait pas d'oxygène.C'est au sein de ce mélange gazeux réducteur que se produisirent les synthèses primordiales de composés organiques sous l'influence de sources variées d'énergie:radiations lumineuses,radiations ultra-violettes de haute énergie, chaleur,radiations atomiques,décharges électriques.

2.Formation d'un océan primitif.

La température de la Terre diminuant,la vapeur d'eau se condensait et entraînait avec elle les composés organiques pour former un océan primitif qui,d'après l'expression imagée de HALDANE,ressemblait à une "soupe chaude diluée";ce milieu aqueux devait renfermer des substances organiques variées parmi lesquelles de nombreux composés d'intérêt biologique.

3.Apparition de systèmes polymacromoléculaires.

Dans l'océan primitif,ou plutôt dans des lagunes périphériques,se formèrent des substances de poids moléculaire plus élevé par polymérisation des composés synthétisés au cours de la première étape; par exemple des protéines rudimentaires se formèrent à partir des amino-acides.Cependant l'océan primitif, d'après OPARIN,ne devait pas renfermer de fortes concentrations en composés organiques;or,la vie n'est observable que pour des systèmes très concentrés;aussi OPARIN a-t-il recours au phénomène de la coacervation pour expliquer ce changement décisif de la concentration de la matière organique.Les coacervats auraient donc représenté les premiers systèmes polymacromoléculaires,systèmes thermodynamiquement ouverts qui,progressivement, ont acquis les attributs fondamentaux des cellules vivantes: membrane semi-perméable permettant des échanges de matière et d'énergie avec le milieu aqueux ambiant,d'où apparition d'un métabolisme rudimentaire,de phénomènes de croissance et d'autoreproduction.Ces premiers êtres vivants ,dénommés"éobiontes" par PIRIE (105),étaient hétérotrophes.

4.Evolution des éobiontes.

OPARIN transpose aux éobiontes la notion darwinienne de sélection naturelle ;au fur et à mesure de leur multiplication les éobiontes saprophytes ont assez rapidement consommé les molécules organiques de l'océan primitif et il a donc fallu qu'un processus nouveau intervienne pour assurer la continuation de la vie;seuls les systèmes capables d'adapter leur métabolisme aux conditions changeantes du milieu ont pu survivre;il semble que cette crise ait été résolue par un système utilisant l'énergie de la lumière solaire :les organismes autotrophes effectuant la photosynthèse ont alors rapidement envahi toute la surface de la Terre et ont dégagé de l'oxygène;la respiration serait apparue simultanément ou secondairement par rapport à la photosynthèse.

x

x x

Le grand mérite des théories d'OPARIN et de HALDANE est d'avoir suscité depuis une quinzaine d'années un très grand nombre de recherches expérimentales qui ont enregistré des résultats très importants venant à leur tour féconder et compléter la théorie évolutionniste de la biogénèse.La première vérification expérimentale de l'hypothèse de HALDANE a été effectuée en 1951 par l'école de CALVIN (34):bombardant un mélange de gaz carbonique et de vapeur d'eau par les radiations ionisantes d'un cyclotron,ces chercheurs observent la formation d'acide formique, d'acide acétique et d'acide oxalique.En 1953 MILLER (80,81) réalise une expérience fondamentale pour vérifier le point de départ de la théorie d'OPARIN;soumettant des mélanges gazeux reproduisant l'atmosphère terrestre supposée primitive (NH_3,CH_4,H_2,H_2O)à la simple action de décharges électriques répétées,MILLER obtient la synthèse de composés quaternaires parmi lesquels plusieurs acides aminés naturels.Ces deux expériences ont véritablement ouvert la voie à l' "abiogénèse chimique

expérimentale"(*):cette nouvelle branche de la chimie organique, reliée étroitement à la chimie biologique,se propose de recréer au laboratoire les principales étapes de la biogénèse;plus particulièrement elle se propose d'étudier en premier lieu les synthèses organiques abiotiques et de confronter ses résultats avec les données apportées par une nouvelle discipline dénommée par ORO (97)"cosmochimie organique":celle-ci étudie les réactions chimiques organiques se déroulant dans l'univers.Une revue d'ensemble très complète sur les résultats enregistrés par ces nouvelles disciplines vient d'être publiée par de ROSNAY(115).

Notre travail rentre dans le cadre théorique de l'évolution pré-biologique et dans le cadre expérimental de l'abiogénèse chimique.Soulignons d'emblée que les méthodes et les buts qui guident les recherches concernant les synthèses abiotiques sont très différents de ceux de la chimie organique classique ;en effet il ne s'agit pas du tout d'utiliser les méthodes ingénieuses mais artificielles de synthèse mises au point par les chimistes organiciens et qui tendent principalement à obtenir des produits purs avec un bon rendement,mais plutôt de favoriser et d'observer des phénomènes naturels et spontanés;il importe donc en premier lieu de réunir des éléments matériels très simples ,tels qu'on peut supposer qu'ils se soient trouvés réunis dans les conditions géophysiques primitives ou encore tels qu'on les observe dans les conditions géologiques actuelles;on peut apporter de l'énergie sous une forme dont l'existence a été probable sur la Terre primitive:lumière solaire,radiations ultra-violettes,chaleur,décharges électriques,radiations atomiques,ultra-sons...L'expérience a montré qu' à l'issue de la réaction,on obtient le plus souvent un mélange très complexe ne renfermant que de faibles quantités de composés organiques d'intérêt biologique dont la mise en évidence exige des méthodes très fines d'analyse ,comme la chromatographie ou l'électrophorèse;en réalité peu importe si les rendements obtenus au

(*) PIRIE estime que le terme "biopoïèse" serait plus heureux que le terme "abiogénèse" crée par HUXLEY pour désigner la vie qui apparaît de novo;on emploie encore également le terme "biogénèse".

laboratoire en quelques heures sont très faibles(de l'ordre du 1/100 ème,du 1/1000 ème ou moins):en effet,à l'échelle des temps géologiques et dans de vastes volumes les quantités de matières organiques synthétisées ont pu être très grandes.Il importe enfin de respecter des conditions expérimentales aseptiques de façon à éviter la synthèse de composés biologiques par un apport microbien.En résumé,les expériences de synthèses abiotiques sont très particulières,en général très différentes de celles de la chimie organique classique et encore plus éloignées des expériences de génération spontanée effectuées par les alchimistes ou même par les auteurs du XIX ème siècle tels que POUCHET (109).

Le début des recherches d'abiogénèse expérimentale à partir du cyanure d'ammonium se situe après les travaux de MILLER;en effet,à la suite de son expérience fondamentale, MILLER (82)a reconnu que l'acide cyanhydrique et la formaldéhyde sont des produits intermédiaires clefs pour comprendre le mécanisme des synthèses abiotiques des composés organiques à partir des molécules gazeuses de l'atmosphère supposée primitive.Après les découvertes de MILLER,de nombreuses synthèses organiques ont été réalisées avec les conditions expérimentales les plus simples en partant de ces deux composés intermédiaires;en effet une solution aqueuse de formaldéhyde peut se polymériser spontanément en milieu alcalin pour donner un mélange d'oses naturels (76,98,108) ou encore on peut obtenir des amino-acides naturels en éclairant simplement par la lumière solaire une solution aqueuse de paraformaldéhyde contenant des ions NO_3^- et du chlorure ferrique(5);d'autre part,le simple chauffage du cyanure d'ammonium en solution dans l'eau a parmis à ORO et coll. dès 1960 (93,95,96,99-101)puis à LOWE et coll. en 1963 (71,72)d'obtenir de nombreux composés d'intérêt biologique:de l'urée,certains dérivés imidazoliques,plusieurs acides aminés naturels et même de l'adénine.De notre côté,en 1963, nous avons repris les travaux de ORO et de LOWE.

Avant d'exposer nos propres recherches nous rappellerons d'autres travaux antérieurs ou postérieurs concernant l'acide

cyanhydrique ou le cyanure d'ammonium.Il est actuellement possible de replacer dans le cadre de l'évolution pré-biologique certaines expériences anciennes qui sont rapportées dans la littérature chimique;LANGE (64) en 1897 a obtenu avec un bon rendement du cyanure d'ammonium en faisant passer un mélange gazeux très simple (NH_3,H_2,N_2)sur du charbon chauffé à 1000°C; des expériences assez semblables à celles de MILLER ont été faites entre 1931 et1935:du cyanure d'ammonium est obtenu par l'action de décharges électriques sur des mélanges de gaz ammoniac et de méthane par PETERS et KÜSTER (104) ou sur des mélanges de N_2,H_2 et C_2H_2 par EGGERS (22);d'autre part dès 1874,WIPPERMANN (142) obtint de la glycine après hydrolyse alcaline d'un composé lui-même obtenu par polymérisation spontanée d'une solution aqueuse alcaline de HCN.La cosmochimie organique de son côté a décelé la présence de radicaux -CN, >NH,-NH_2,-OH dans les comètes,après leur analyse spectrale (18,94):ces découvertes confirment l'intérêt des recherches au laboratoire sur le comportement des mélanges de HCN et de NH_4OH.Le géophysicien ABELSON (1) reproche cependant à l'abiogénèse expérimentale de n'avoir pas assez tenu compte des données de la géologie et de la géophysique.Il affirme que l'hypothèse d'une atmosphère terrestre primitive composée de méthane et de gaz ammoniac est sans fondement solide ;en effet en se référant à la composition des gaz des volcans actuels (H_2O,CO_2,N_2,H_2,CO),il serait logique d'attribuer à l'atmosphère primitive une composition semblable;aussi,ABELSON a-t-il refait les expériences de MILLER mais en partant d'un mélange gazeux différent:l'action de décharges électriques sur un mélange d'azote ,d'oxyde de carbone et d'hydrogène conduit à la formation prépondérante de HCN et H_2O,à côté de faibles quantités de méthane et d'anhydride carbonique;ABELSON souligne qu'il lui a été impossible de mettre en évidence le formaldéhyde dans les produits de la réaction;d'autre part HCN est lentement hydrolysé en ammoniaque et acide formique .ABELSON conclut ,que,tout au début,l'océan primitif renfermait comme

principal composé organique l'acide cyanhydrique;du fait de l'action permanente du rayonnement ultra-violet intense d'origine solaire sur l'atmosphère primitive (*),l'océan primitif se rechargeait constamment en HCN,très soluble dans l'eau;cependant, par suite de l'hydrolyse de HCN,la concentration de l'océan primitif en acide cyanhydrique n'a sans doute pas dépassé 10^{-4}M alors que la concentration en formaldéhyde devait être beaucoup plus faible;pour ABELSON le pH de l'océan primitif devait être compris entre 8 et 9.Tenant compte de ces considérations et des résultats apportés par l'abiogénèse expérimentale,ABELSON estime que l'océan primitif n'a jamais pu contenir de grandes quantités d'oses mais au contraire qu'il s'est enrichi progressivement en amino-acides;en effet,l'auteur a observé qu'une solution aqueuse diluée de HCN, d'un pH compris entre 8 et 9,après irradiation par des rayons U.V.(λ =2536Å),laisse apparaître des composés qui,après hydrolyse chlorhydrique,fournissent de la glycine,de l'alanine,de la sérine,de l'acide aspartique et de l'acide glutamique.De cette mise au point critique publiée par ABELSON,nous retenons essentiellement que,si la formaldéhyde est contestée comme intermédiaire des réactions de synthèses abiotiques,le cyanure d'ammonium est au contraire mis en valeur.

Nous signalerons enfin que les recherches expérimentales sur l'abiogénèse commencent à trouver des applications dans l'industrie chimique;en effet,poursuivant les travaux de ORO et KIMBALL (100),WAKAMATSU et coll.(139),de la firme japonaise Ajinomoto,ont mis au point en 1966 un nouveau procédé de synthèse de l'adénine permettant de préparer ce composé avec un rendement de 22°/$_o$ et avec un prix de revient très bas,par polymérisation spontanée de HCN en présence d'ammoniac, en milieu anhydre et à la température de 80°C;de plus la réaction fournit un dérivé imidazolique intéressant pour d'autres synthèses,le 4,5-dicyano-imidazole,avec un rendement de 21°/$_o$.

x x x

(*)Celle-ci ne comportait pas l'écran d'ozone qui nous protège actuellement contre les rayons U.V.

x

x x

Pour exposer nos résultats expérimentaux qui ont fait l'objet de cinq publications (59-63), nous avons adopté le plan suivant:

PREMIERE PARTIE

Transformations d'une solution aqueuse de cyanure d'ammonium sous l'influence de la chaleur.

Chapitre premier.-Recherche d'un protocole expérimental.

I.-Préparation d'une solution aqueuse de cyanure d'ammonium.

II.-Chauffage de la solution de cyanure d'ammonium.

III.-Premières opérations de fractionnement et d'analyses des produits obtenus à partir du cyanure d'ammonium.

A. Le précipité noir.

B. Le surnageant.

IV.-Influence de la température et du temps de chauffage.

V.-Influence du pH du milieu réactionnel.

Chapitre II.-Protocole et résultats des opérations de fractionnement et d'analyses.

I.-Le précipité noir d'acides azulmiques.

II.-Le surnageant.

A. Analyse du surnageant avant l'hydrolyse chlorhydrique.

B. Hydrolyse chlorhydrique du surnageant et analyses consécutives.

Chapitre III.-Influence de certains composés minéraux sur les transformations d'une solution aqueuse de cyanure d'ammonium.

DEUXIEME PARTIE

Les acides azulmiques obtenus à partir du cyanure d'ammonium.

Chapitre premier.-Les acides azulmiques noirs.

I.-Propriétés physico-chimiques des acides azulmiques noirs.

II.-Analyse chimique des acides azulmiques noirs.

A. Hydrolyse chlorhydrique ménagée.

B.Hydrolyse par la baryte.

C.Essais d'hydrolyses enzymatiques.

D.Essais de mise en évidence des groupements aminés libres.

III.-Action de certains micro-organismes sur les acides azulmiques noirs.

IV.-Propriétés catalytiques des acides azulmiques noirs.

Chapitre II.-Les acides azulmiques du surnageant.

I.-Les microsphérules.

A.Préparation et étude morphologique.

B.Propriétés physico-chimiques des microsphérules.

C.Analyse chimique des microsphérules.

II.-Les acides azulmiques dissous dans le surnageant.

Chapitre III.-Structure des acides azulmiques obtenus à partir du cyanure d'ammonium.

I.-Mécanisme de formation et structure.

II.-Discussion.

ADDENDUM

CONCLUSIONS GENERALES

P R E M I E R E P A R T I E

TRANSFORMATIONS D'UNE SOLUTION AQUEUSE DE CYANURE D'AMMONIUM SOUS L'INFLUENCE DE LA CHALEUR.

CHAPITRE PREMIER

RECHERCHE D'UN PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

Nous décrirons d'abord une série d'expériences préliminaires qui nous ont permis d'examiner divers facteurs influençant la transformation d'une solution de cyanure d'ammonium dans l'eau. Les renseignements ainsi obtenus nous ont amenés à sélectionner progressivement un protocole expérimental convenable pour la suite de nos recherches.

Nous rapporterons d'abord la préparation du milieu réactionnel constitué par une solution aqueuse de cyanure d'ammonium, puis certaines conditions de transformation de cette solution par la simple action de la chaleur ; nous examinerons également les premières opérations de fractionnement du mélange complexe obtenu, ainsi que les procédés analytiques utilisés pour apprécier divers rendements.

I.Préparation d'une solution aqueuse de cyanure d'ammonium.

A la différence des cyanures alcalins,le cyanure d'ammonium n'est pas disponible dans le commerce en raison de son instabilité;il est donc nécessaire de préparer la solution de NH_4CN extemporanément à partir de l'acide cyanhydrique et de l'ammoniaque.

HCN gazeux est préparé par action de l'acide sulfurique dilué au demi sur NaCN(135) et recueilli dans l'eau distillée de façon à obtenir une solution d'acide cyanhydrique environ 7 M dont le titre en ions CN^- est déterminé par argentimétrie (67); cette solution est stabilisée (*) par adjonction de deux gouttes d'acide chlorhydrique dilué au demi pour 100ml de solution et conservée à l'obscurité en glacière à + 4°C.

La neutralisation de HCN par une quantité stœchiométrique de NH_4OH est effectuée extemporanément de façon à obtenir une solution aqueuse molaire de NH_4CN.

II.Chauffage de la solution de cyanure d'ammonium.

Chaque expérience a été effectuée à partir de 100ml de la solution de NH_4CN,M.Cette solution,primitivement incolore, abandonnée à température ordinaire jaunit assez rapidement tandis qu'un précipité noirâtre apparaît au bout de quelques heures ;ce phénomène semble avoir été décrit pour la première fois par PROUST en 1806 (111) à l'occasion du vieillissement d'une solution aqueuse d'acide cyanhydrique:

"L'acide prussique dissous dans l'eau,et bien bouché, s'y décompose de lui-même .Il se colore en jaune au bout de quatre à cinq mois.Il perd peu à peu son odeur ,se trouble et dépose un sédiment ,couleur de café qui,après avoir été chauffé,

(*)GEOGHEGAN a montré dès 1836 (37)qu'il suffit d'ajouter de faibles quantités d'un acide pour stabiliser une solution de HCN;nous avons choisi comme stabilisant HCl,acide minéral des plus simples.Nous n'avons pas utilisé de solutions aqueuses d'acide cyanhydrique du commerce qui le plus souvent renferment de l'acide oxalique comme agent de stabilisation:nous avons ainsi voulu éviter l'apport d'un composé carboné qui aurait pu interférer avec les synthèses organiques étudiées dans le présent travail.

présente tous les caractères du charbon".

Pour accélérer la transformation du cyanure d'ammonium nous chauffons notre solution dans un ballon de verre muni d'un agitateur mécanique;la source de chaleur est apportée par un bain d'huile maintenu à température constante.

III.Premières opérations de fractionnement et d'analyses des produits obtenus à partir du cyanure d'ammonium.

Après un temps de chauffage variable,suivi du passage d'une nuit en glacière (à +4°C),on sépare par filtration sur filtre de porosité G_3 le précipité noir du surnageant brun orangé ;le précipité noir est lavé sur filtre à l'eau distillée puis séché et pesé;les eaux de lavage sont ajoutées au surnageant et le dosage des ions CN^- non consommés est effectué.

Les manipulations que nous venons de décrire et les premières opérations de fractionnement et d'analyses que nous réalisons ensuite sont résumées dans le tableau I.

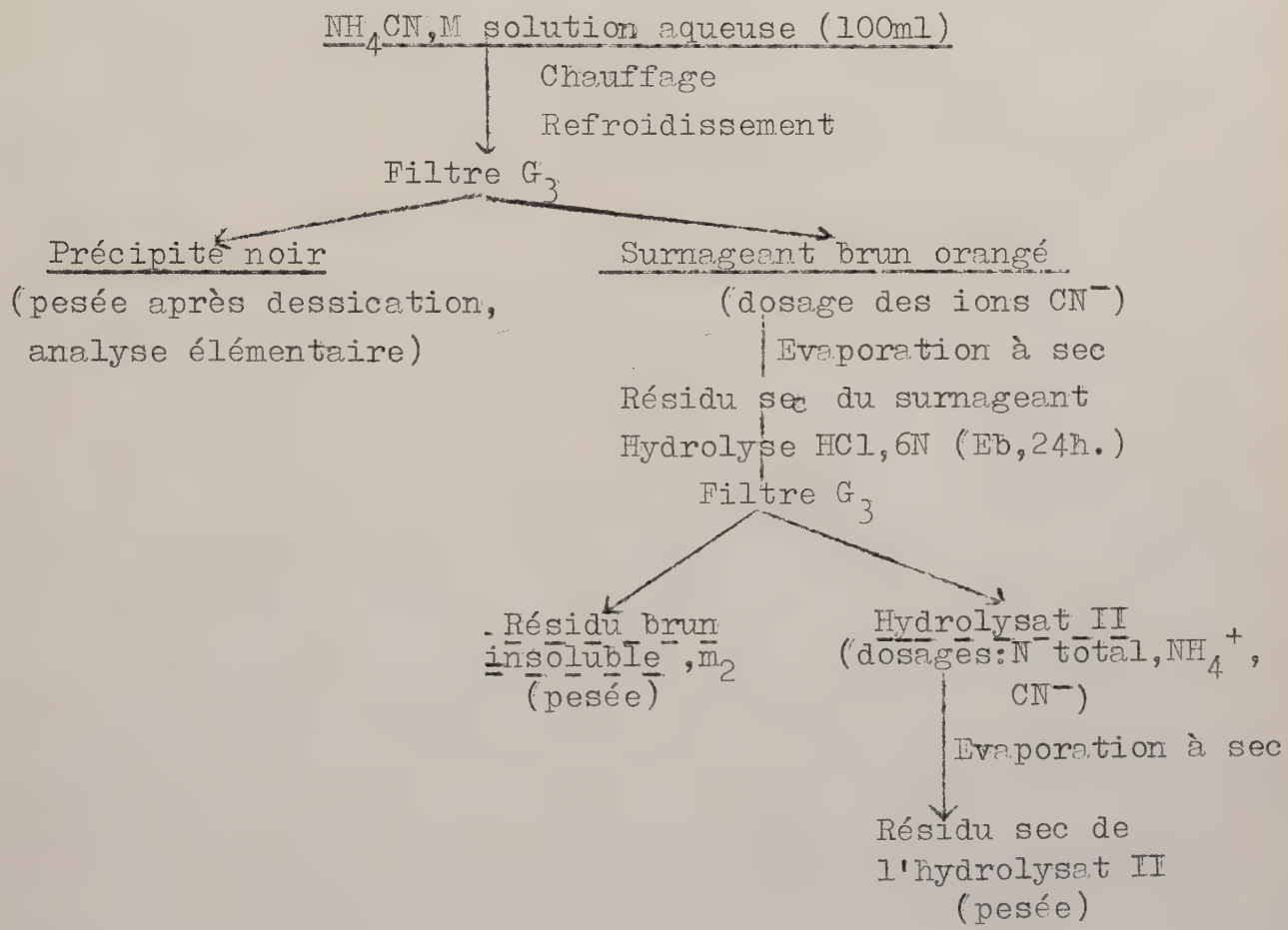
A.Le précipité noir.

A l'état sec ce précipité se présente sous la forme d'une fine poudre noire non hygroscopique;cette substance fut appelée "acide azulmique" par BOULLAY en 1830 (13), puis un peu plus tard on voit apparaître dans la littérature le terme "azulmine" par analogie d'aspect avec la tourbe ou "ulmine".En 1869,GAUTIER (35) souligne que"deux conditions sont necessaires pour que le formonitrile se transforme en acide azulmique:la présence d'un peu d'eau et une trace d'ammoniaque ou d'un alcali";ce même auteur ,un des premiers à admettre la nature polymérique de ce composé,estime que l'azulmine est un polymère de HCN de formule $(HCN)_9O_3$,l'oxygène provenant de l'eau.VÖLKER (136,137) voit dans l'acide azulmique le premier polymère organique qui ait été préparé et montre qu'il s'agit d'une polymérisation anionique pouvant se produire également en milieu anhydre et en l'absence d'oxygène libre ou combiné.

L'analyse élémentaire de divers échantillons d'acides azulmiques noirs (AAN) que nous avons obtenus à partir du cyanure d'ammonium nous a donné la composition centésimale

Tableau I

Chauffage d'une solution de cyanure d'ammonium et premières opérations de fractionnement et d'analyses.



moyenne suivante:

C=38,77; H=3,96; N=40,85; O=16,42.

B.Le surnageant.

le surnageant préparé dans des conditions assez semblables aux nôtres,a été bien étudié par ORO et coll.(93,95,96, 99-101) puis par LOWE et coll. (71,72).Ces auteurs ont montré qu'il s'agit d'un mélange très complexe de composés organiques, parmi lesquels on a décelé de faibles quantités de composés d'intérêt biologique;cependant,après hydrolyse chlorhydrique,le nombre et la quantité de substances biologiques augmentent sensiblement,en particulier les amino-acides.

Dans un premier temps nous avons voulu avoir des renseignements globaux sur les synthèses organiques produites au sein du surnageant.Pour cela nous avons desséché le surnageant et pesé le résidu sec;puis ce résidu sec a été soumis à l'hydrolyse par ébullition dans HCl,6N pendant 24 heures;après refroidissement on sépare par filtration sur filtre G_3 un résidu brun, resté insoluble dans HCl,d'un filtrat orangé (tableau I:hydrolysat II)dans lequelon dose l'azote total par la méthode de GRABAR (40) et avec l'appareil de MARKHAM(77),les ions NH_4^+ par la méthode de FLEURY et LOTH (24) et les ions CN^- selon la technique précitée Ensuite l'hydrolysat II est évaporé à sec et le résidu est pesé.

IV.Influence de la température et du temps de chauffage.

Nous avons ensuite étudié la transformation du cyanure d'ammonium en fonction de la température et du temps de chauffage afin de sélectionner les conditions de chauffage techniquement les plus simples mais donnant cependant un rendement convenable en AAN et en résidu sec du surnageant.

Les résultats sont groupés dans le tableau II.Nous avons étudié des températures de 70°C à 90°C et des temps de chauffage de 2 à 16 heures;nous n'avons pu étudier des températures supérieures à 90°C en raison de la condensation de NH_4CN sur les parties froides du récipient sous la forme d'amas jaunâtres.

Tableau II

Influence de la température et du temps de chauffage sur les transformations du cyanure d'ammonium

Résultats			Chauffage pendant 4 h			Chauffage à la température de 90°C			
			70°C	80°C	90°C	2h	4h	8h	16h
Précipité noir d'AAN		Poids en g	0,380	0,590	0,814	0,550	0,814	0,910	0,960
		Rendement p.100 (calculé par rapport au C)	12,28	19,06	26,30	17,77	26,30	29,40	31,02
SURNAGEANT	Avant hydrolyse	CN⁻ consommés p.100	38,2	58,0	68,8	55,6	68,8	79,0	87,4
		Poids du résidu sec en g.	0,562	0,937	1,210	1,066	1,210	1,450	1,728
	Après hydrolyse	Résidu insoluble m_2 poids en g	0,098	0,130	0,112	0,160	0,112	0,098	0,086
		Poids du résidu sec en g	0,795	1,342	1,683	1,485	1,683	1,650	2,040
	Hydrolysat II	N total	14,25	22,20	27,75	25,50	27,75	30,00	33,33
	Nombre de milliatomes gramme présents dans la totalité	N de NH_4^+	6,75	13,50	20,00	19,35	20,00	22,05	26,25
		Ntotal − ($N_{NH_4^+} + N_{CN^-}$)	6,00	6,30	5,85	4,65	5,85	6,45	6,15

1°.Le précipité noir.

Le poids des AAN augmente avec le temps de chauffage pour une même température de 90°C et tend vers une valeur maximale;d'autre part ,pour un même temps de chauffage,le poids augmente avec la température dans la gamme de 70°C à 90°C.

Nous avons calculé le rendement en AAN p.100 en faisantle rapport:

$$\frac{\text{poids de carbone incorporé dans les AAN}}{\text{poids de carbone fourni sous forme de } NH_4CN} \times 100$$ et en tenant compte du fait que 100 g d'AAN renferment en moyenne 38,77 g de carbone et que 0,1 mole de NH_4CN renferme 1,2 g de carbone.D'où le rendement pour 100 est égal à :

$$\frac{\text{poids d'AAN récolté exprimé en g.} \times 38,77}{1,2}$$

Ce rendement tend vers une valeur maximale de 31 p.100.

2°.Le surnageant.

Le dosage des ions CN^- dans le surnageant nous a permis de chiffrer la disparition de ces ions en fonction du temps et de la température;par exemple,en 4 heures à 90°C, 68,8p.100 des ions CN^-,qui étaient présents au début de la transformation ,sont consommés.

Le poids du résidu sec du surnageant et le poids de l'hydrolysat sec de ce surnageant (tableau II:poids du résidu sec de l'hydrolysat II) manifestent une évolution comparable au poids du précipité d'AAN.

Dans les hydrolysats II nous notons une très forte concentration en ions NH_4^+ ce qui nous a obligé plus tard à passer ces hydrolysats sur une résine anionique avant de les soumettre à l'analyse chromatographique;au contraire ces hydrolysats II contiennent de faibles concentrations en ions CN^- (10 à 20 fois moins que d'ions NH_4^+).

L'étude de la différence Ntotal $-(N_{NH_4^+} + N_{CN^-})$, qui représente la quantité d'azote incorporé dans les synthèses organiques,nous a montré que les hydrolysats II renferment une faible concentration en azote organique,laquelle varie assez peu

en fonction de la température et du temps de chauffage.

Enfin le poids du résidu du surnageant non dissous dans HCl,6N à l'issue de 24 heures d'hydrolyse (tableau II:résidu insoluble,m2) a une valeur relativement faible et cette valeur diminueprogressivement avec le temps pour une température de 90°C.

V.Influence du pH du milieu réactionnel.

Le milieu réactionnel a un pH initial de 9,58,puis ce pH augmente légèrement au cours du chauffage à 90°C pour atteindre la valeur de 10,00 au bout de la quatrième heure;ensuite, si le chauffage est poursuivi, le pH ne varie que très peu puisque après 24 heures à 90°C,le pH est de 10,02.

Si nous modifions le pH initial,par une adjonction de HCl ou de NaOH, nous constatons que,pour des valeurs de pH inférieures à 8 ou supérieures à 10,5,le mélange réactionnel reste pratiquement incolore après 4 heures de chauffage à 90° C, sans formation de précipité noir;pour un pH initial égal à 9 ou 10 nous n'avons récolté respectivement que 0,20 g et 0,11 g d'AAN;le rendement optimum serait donc obtenu à pH=9,58.

Par ailleurs,en présence d'une quantité de NH_4OH double de la quantité stoechiométrique,le poids de précipité noir qui se forme à 90°C n'est que de 0,255 g après 4 heures et de 0,487 g après 24 heures;on peut admettre qu'en ces conditions la cinétique de la réaction est différente et,en outre,que cette diminution de rendement en AAN est due à l'augmentation du pH du milieu réactionnel:le pH initial est alors égal à 9,86 et sa valeur passe à 10,12 après 24 heures de chauffage à 90°C.

Il est bien entendu que toutes les mesures de pH ont été effectuées à la température de 20°C,après refroidissement des milieux réactionnels.

Conclusions du chapitre premier.

Un chauffage à 90°C pendant 4 heures nous donne un rendement qui n'est plus très éloigné de sa valeur maximum lorsque le pH initial est égal à 9,58, pH qui est celui d'une solution aqueuse molaire de cyanure d'ammonium.

Pour les expériences suivantes, nous avons donc adopté les conditions opératoires ci-dessous: 100 ml d'une solution aqueuse de NH_4CN, M sont chauffés pendant quatre heures à la température de 90°C, puis le milieu réactionnel est laissé en glacière à +4°C pendant une nuit, à la suite de quoi les opérations de fractionnement et d'analyses sont effectuées.

CHAPITRE II

PROTOCOLE ET RESULTATS DES OPERATIONS DE FRACTIONNEMENT ET D'ANALYSES.

Le milieu réactionnel, initialement fort simple (H_2O et NH_4CN), est transformé, sous la simple action de la chaleur, en un mélange hétérogène très complexe; parmi les multiples composés organiques ayant pris naissance nous nous sommes surtout attachés à identifier et à doser les composés d'intérêt biologique dans les diverses fractions que nous avons séparées.

I. Le précipité noir d'acides azulmiques.

Nous avons fait une étude assez approfondie de ces polymères noirs (63,61,60) mais dans ce chapitre nous ne décrirons que leur hydrolyse chlorhydrique et les substances libérées par cette hydrolyse ; en effet, en raison de la nature polymérique des AAN, nous en avons fait l'hydrolyse pour connaître leurs constituants.

Avant de passer en revue les résultats obtenus nous donnerons des précisions sur les méthodes d'analyse chromatographique utilisées.

1°. Chromatographie sur colonne de résines échangeuses d'ions.

Le fractionnement des hydrolysats des AAN est effectué sur résine Dowex-2 x8 (200 à 400 mesh sous forme HO^-) dans une colonne en verre (10x1 cm). La détermination des aminoacides a été réalisée sur résine Dowex-50 x4 (colonne : 130x0,6cm) avec l'auto-analyseur Technicon (Chauncey).

2°. Chromatographie bidimensionnelle sur papier.

Les deux fractions de l'hydrolysat séparées après passage sur la résine Dowex-2 sont soumises à la chromatomatographie bidimensionnelle sur papier Whatman 3MM. Les phases solvantes employées sont groupées dans la liste ci-dessous :

(Bu-Ac)=n-butanol,acide acétique,eau (12:3:5,v/v).
(Ph-Am)=phénol:1000g,eau:250ml,NH_4OH(d=0,88):6ml.
(Bu-P)=n-butanol,pyridine,eau (1:1:1,v/v).
(Me-F)=méthanol,acide formique à 90p.100,eau (16:3:1,v/v).
(Bu-E)=n-butanol,eau (172:28,v/v).
(E)=eau distillée (*).

Les chromatogrammes sont examinés en lumière U.V. (λ=254 mμ ou 350 mμ),ou traités par divers réactifs de révélation: solutions acétoniques de ninhydrine à 0,5p.100 ou d'isatine à 0,2p.100 pour les amino-acides;réactif d'Ehrlich pour l'urée; réactif au diacétyle (124) ou réactif au ferricyanure-nitroprussiate (124)pour la guanidine et ses dérivés;réactif de Pauly(124) pour les dérivés imidazoliques.

Certaines taches ont été découpées puis éluées par un séjour de 20 minutes à 60°C dans 5ml de HCl 0,1N;après refroidissement nous avons déterminé leur spectre d'absorption aussi bien dans HCl,0,1N que dans NaOH,0,1N(spectrophotomètre enregistreur UNICAM SP 800).

x

x x

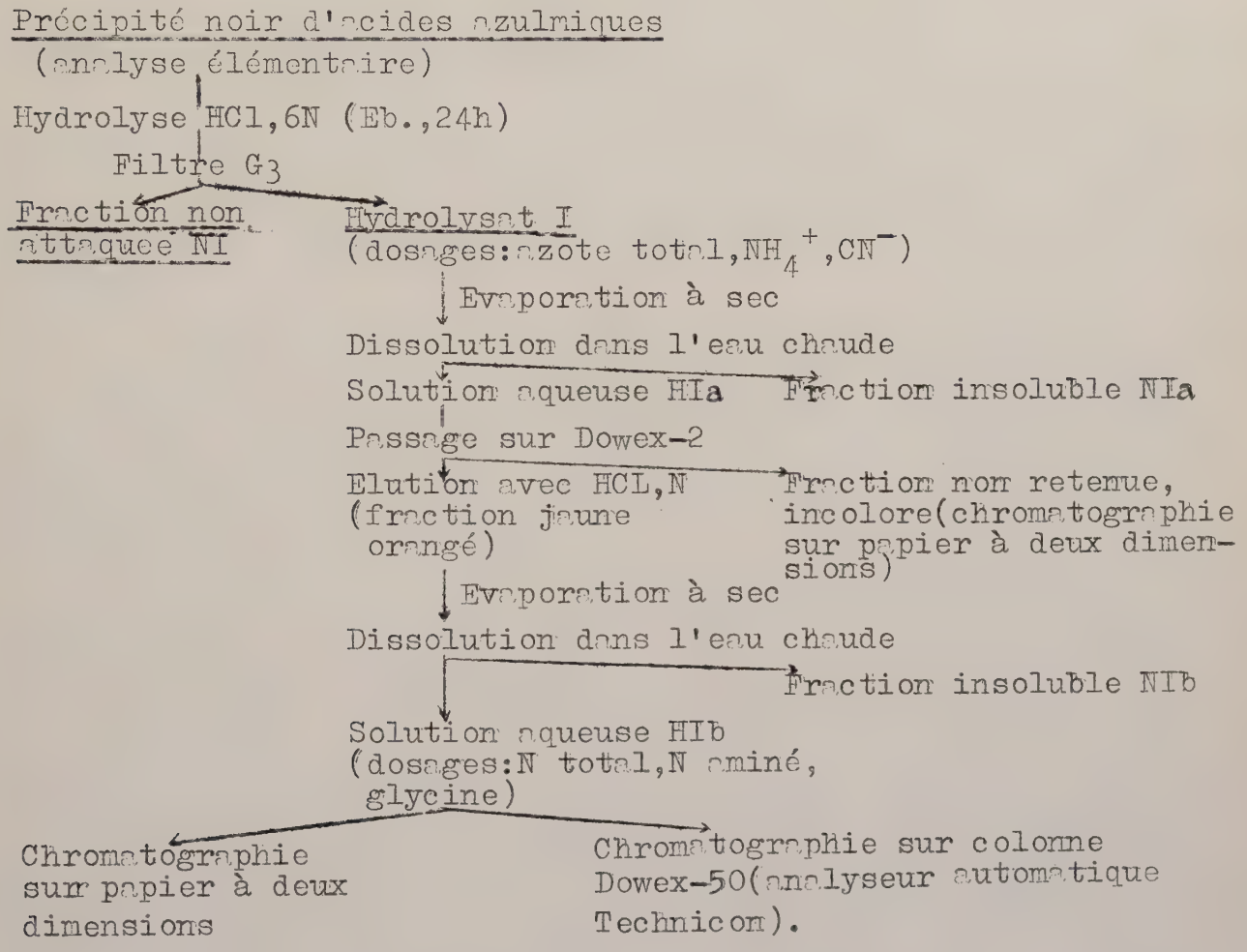
Les principales étapes de l'hydrolyse des AAN par l'acide chlorhydrique et les opérations consécutives d'analyses sont schématisées dans le tableau III.

Les AAN (0,814g)ont été soumis à l'ébullition à reflux dans HCl,6N pendant 24 heures(tableau III) ;à l'issue de cette hydrolyse il reste encore 58p.100 de substances noirâtres NI non dissoutes dans HCl par rapport au poids initial;ce résidu (**) insoluble a été séparé par filtration;le filtrat (hydrolysatI) de couleur orangée renferme :

(*)Nous utilisons parfois simplement l'eau distillée dans le premier sens de migration pour réaliser un désalage par ce solvant qui entraîne vers le front la plupart des substances très hydrosolubles:acides aminés et sels minéraux.
(**)Le dosage des AAN après dissolution de ce résidu dans le diméthylsulfoxyde (voir deuxième partie,chapitre premier pour la technique)montre que ce résidu est constitué de 99p.100 d'AAN.

TABLEAU III.

Hydrolyse chlorhydrique du précipité noir d'AAN;séparation puis analyse des fractions obtenues.



N total:13 milli atomes gramme

NH_4^+ : 9,8 milli ions gramme

CN^- :0,65 milli ions gramme

$N_{total}-(N_{NH_4}+N_{CN^-})$:2,55 milli atomes gramme .

Ensuite ce filtrat a été évaporé à sec :on récolte 0,822g de poudre brun clair.Après dissolution dans 40 ml d'eau chaude (60 mg restent insolubles:fraction NIa),cet hydrolysat HIa est passé sur la résine Dowex-2,qui nous a permis de séparer deux fractions:

a)Une fraction non retenue,alcaline incolore,éluée par l'eau,qui,après concentration sous pression réduite est soumise à la chromatographie bi-dimensionnelle sur papier avec les phases solvantes:Bu-Ac puis Bu-E.L'aspect de ces chromatogrammes est schématisé sur la figure I.

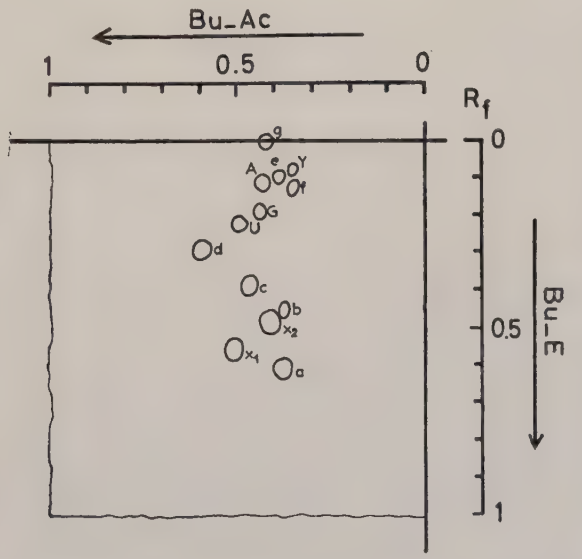
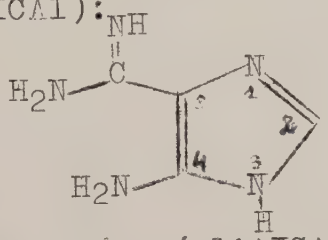


Fig.I.Chromatographie à deux dimensions sur papier,de la fraction non retenue par la résine Dowex-2 de l'hydrolysat des AAN.Une bonne séparation des taches est obtenue en laissant déborder largement le solvant dans les deux directions.

En lumière ultra-violette, la tache A présente un aspect bleu-violet non fluorescent et, après élution, nous avons obtenu le spectre caractéristique en U.V. de l'amino-4-carboxamidine-5-imidazole(AICAI):



Nous avons préparé l'AICAI par hydrolyse de l'Adénine par HCl,6N(Eb,4h)(*). L'AICAI a déjà été identifié par ORO (95,96,101) dans le surnageant; grâce au dosage spectrophotométrique en U.V. nous avons estimé à 8,6 µmoles la quantité d'AICAI contenue dans 822mg de l'hydrolysat I.

(*) L'amino-4-carboxamidine-5-imidazole (AICAI) a été préparé sous forme de dichlorhydrate par hydrolyse acide de l'adénine (hydrate de l'hémisulfate, grade I, Cyclo) selon la méthode décrite par CAVALIERI et coll. (15). Malgré quatre cristallisations successives dans l'éthanol - HCl, nous n'avons pu obtenir un produit chromatographiquement pur: en effet, une chromatographie bidimensionnelle sur papier (Me-F, puis Bu-E) nous a montré la présence d'une petite quantité d'adénine et de traces d'hypoxanthine; nous avons élué le spot correspondant à l'AICAI et fait son spectre d'absorption en U.V. qui présente un maximum à λ =282 mµ dans HCl 0,1N et à λ=292 mµ dans NaOH 0,1N; sur les chromatogrammes le spot d'AICAI est révélable en bleu-violet en lumière ultra-violette (λ =254 mµ), en jaune par le réactif d'Ehrlich, en violet par le réactif au ferricyanure nitro-prussiate, en gris violacé par le réactif au diacétyle, en grenat par le réactif de Pauly et en orangé par l'isatine; le R_f est de 0,63 dans le solvant Me-F, 0,10 dans le solvant Bu-E, 0,52 dans le solvant Bu-P, 0,40 dans le solvant Bu-Ac. Nous avons obtenu l'AICAI sous forme de base chromatographiquement pure après passage de notre préparation d'AICAI, 2HCl en solution aqueuse sur la résine Dowex-2: l'AICAI n'est pas retenu par cette résine et est élué simplement par l'eau.

Plusieurs taches sont révélables par le réactif de Pauly:A en grenat,a,c,e,f,en rose,b en orangé virant ensuite au rose,d en violet fugace,g en jaune fugace;en plus de A il semble que plusieurs de ces taches correspondent à des dérivés imidazoliques. U et A sont des spots jaunes après application du réactif d' d'Ehrlich;U correspond à l'urée (*).

G et Y sont révélables en rouge par le réactif au diacétyle et correspondent respectivement à la guanidine et à la glycocyamine.

Le réactif au ferricyanure-nitroprussiate colore plusieurs spots:A en violet,G en ocre,Y en rose,d et e en rose virant au violet.

Nous n'avons pu identifier les taches x_1 et x_2,de couleur bleu-clair en lumière ultra-violette.

b)Une fraction renfermant plusieurs amino-acides , éluée par HCL,N(**):cet éluat,de couleur jaune orangé,après évaporation fournit un résidu sec pesant 0,197g;ce résidu est à son tour dissous dans 20ml d'eau chaude (là encore une fraction reste insoluble,fraction NIb d'un poids de 10mg);sur cette solution HIb nous pratiquons des chromatographies bi-dimensionnelles sur papier avec plusieurs couples de phases solvantes:

-avec le couple précédemment utilisé ,nous avons obtenu des chromatogrammes présentant une dizaine de spots révélables par le réactif de Pauly;parmi ceux-ci il se trouve un spot T très important qui apparaît en bleu-violet en lumière U.V.,en orangé après la révélation de Pauly et dont le R_f dans le système Bu-Ac est égal à 0,44 et 0,33 dans le système Bu-E;le liquide d'élution de ce spot présente un maximum d'absorption à λ=256 mμ(dans HCl,0,1N) et deux maxima à λ=260 et 287 mμ(dans NaOH, 0,1N).

(*)L'urée a été dosée par le diacétyl-monoxime (92) dans la fraction HIa:celle-ci en renferme 39 μmoles.

(**) Après élution par HCl,il reste encore une zone brune fixée sur la résine qu'il est impossible d'éluer.

-avec les couples Bu-Ac pour la première direction et Bu-P ou Ph-Am pour la deuxième direction nous avons pu identifier 7 amino-acides parmi 11 taches ninhydrine- positives;la figure 2, qui représente un chromatogramme obtenu avec les phases solvantes Bu-Ac et Bu-P,montre:

-d'une part les spots ninhydrine -positifs;parmi ceux-ci les spots numérotés de 1 à7 correspondent respectivement aux acides aminés suivants:glycine,ac.α-amino-butyrique,ac. aspartique (*),alanine,histidine (**),thréonine,sérine(la tache correspondant à la glycine est de loin la plus importante);il existe en outre deux taches (8 et 9) révélables en bleu-violacé pâle par la ninhydrine,et deux taches (10 et T)révélables en jaune par ce même réactif;cette dernière tache correspond exactement au spot T déjà décrit:son R_f dans la phase solvante Bu-P est égal à 0,74 et à 0,70 dans la phase solvante Ph-Am;

-d'autre part les spots visibles en lumière ultra-violette :en premier lieu les spots T,a et b d'un bleu violet,ensuite les spots bleu clair :c,d,e,f.

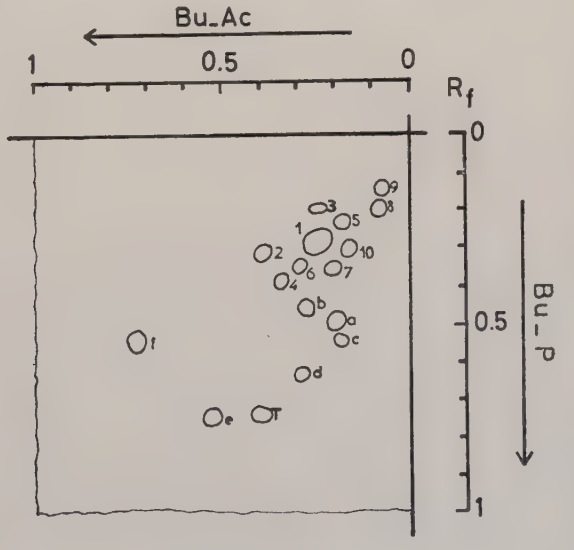


Fig.2.Chromatographie à deux dimensions sur papier de la fraction HIb éluée de la résine Dowex-2 par HCl,N.

(*)Le spot 3 est bleu après révélation par l'isatine.
(**)Le spot 5 est rose après application du réactif de Pauly.

Dans la solution HIb nous avons en outre réalisé le dosage de l'azote total, celui de l'azote aminé (130) ainsi que celui de la glycine (3). Nous avons enfin soumis cette solution à l'analyse chromatographique sur résine Dowex-50 et les résultats en sont consignés dans le tableau IV.

Tableau IV.

Substances identifiées par chromatographie sur résine Dowex-50(*) et dosées dans l'éluat HCl, fraction HIb, de l'hydrolysat des polymères noirs.

(Les résultats sont exprimés en µ atomes-gramme, en µ ions-gramme, en µ moles selon les cas).

Substances	Résultats pour la totalité de la solution HIb.
Azote total	1845
Azote aminé	787
NH_4^+	40
Glycine	594
Ac. γ-amino-butyrique	16
Ac. aspartique	15
Alanine	8
Histidine	1,6
Thréonine	<1
Sérine	<1
Lysine	<1
Ornithine	<1
Urée	traces
v_1	2,6
v_2	13
v_3	4

(*) Trois composés ninhydrine-positifs supplémentaires n'ont pu être identifiés: v_1 est élué avant l'ac. aspartique, v_2 et v_3 sont élués à la fin, après l'histidine.

Conclusion.

Au cours de l'hydrolyse chlorhydrique, les acides azulmiques noirs ont la curieuse propriété de libérer de faibles quantités de composés d'intérêt biologique: des amino-acides naturels, de l'urée, de la guanidine, de la glycocyamine et certains dérivés de l'imidazole parmi lesquels l'histidine et l'amino-4-carboxamidine-5-imidazole qui est un précurseur immédiat de l'adénine.

II.Le surnageant.

Le surnageant a été d'abord analysé à l'état brut par chromatographie bi-dimensionnelle sur papier;après évaporation à sec,le résidu a été,soit repris par l'eau chaude pour des dosages d'urée et de glycine,soit soumis à une hydrolyse chlorhydrique semblable à celle décrite précédemment pour les AAN.Ces opérations multiples sont résumées dans le tableau V.

A. -Analyse du surnageant avant l'hydrolyse chlorhydrique.

Nous avons déposé 0,6ml de surnageant (non additionné des eaux de lavage des AAN)sur du papier Whatman 3MM et effectué des migrations chromatographiques bi-dimensionnelles avec différents couples de phases solvantes;les meilleures séparations ont été obtenues avec le couple E pour la première direction puis Me-F pour la deuxième:un chromatogramme de ce type est reproduit dans la figure 3 dont le nombre élévé de taches objective la complexité du mélange.

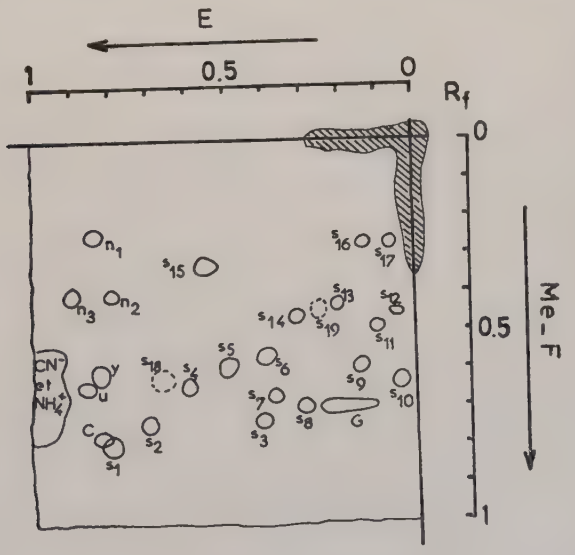
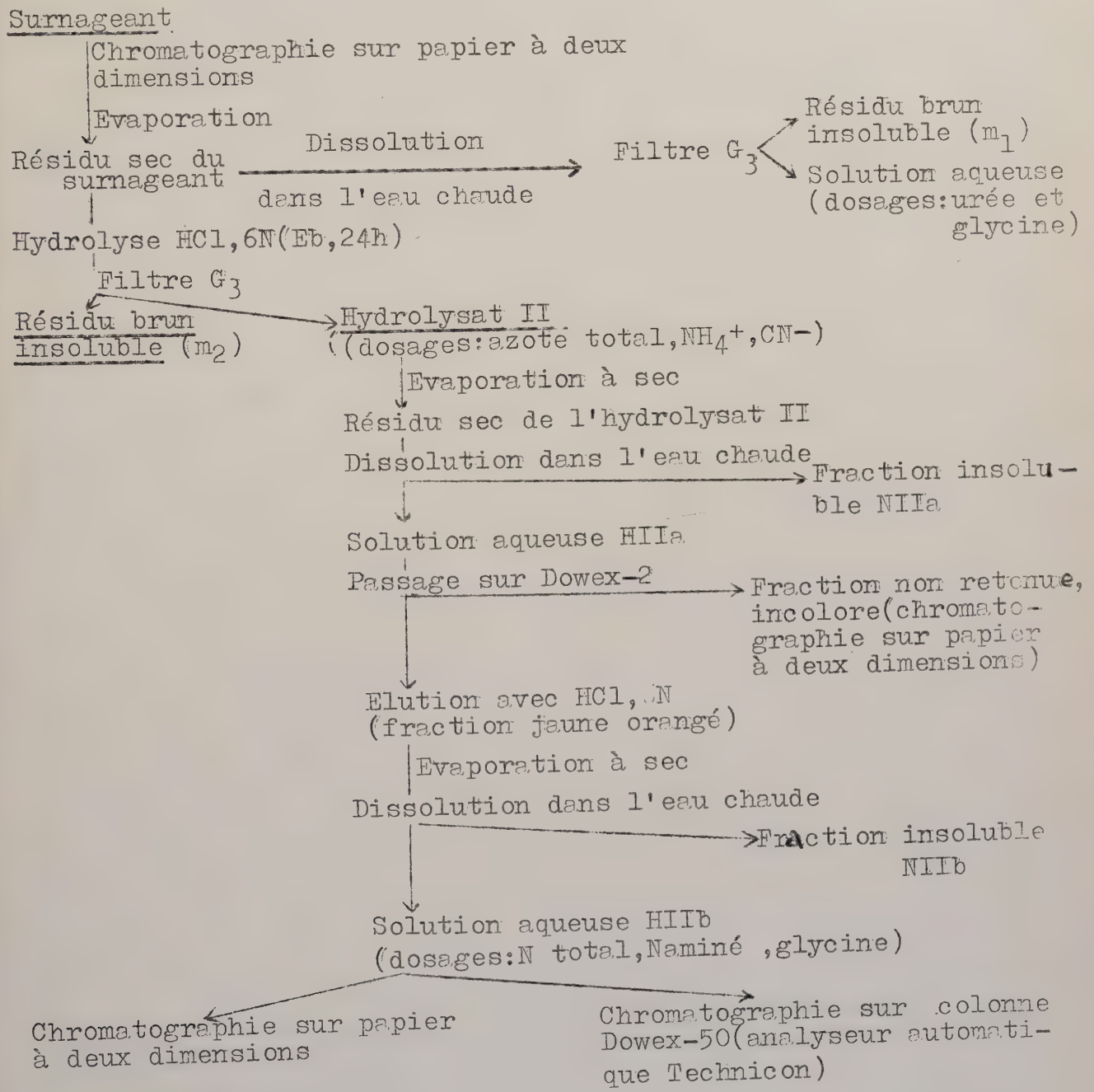


Fig.3-Chromatographie bidimensionnelle sur papier du surnageant.

Tableau V.

Fractionnement et hydrolyse chlorhydrique du surnageant.



Signalons d'abord que près du point de départ on voit en lumière visible un spot brun très important (hachuré sur la figure 3) qui semble bien correspondre à des acides azulmiques restés en solution dans le surnageant.

En lumière U.V., à λ =254 mμ on distingue 17 spots (S_1 à S_{17}) et à λ =350 mμ deux spots supplémentaires (S_{18} et S_{19}). Les spots Y et G, correspondant respectivement à la glycocyamine et à la guanidine, ont été révélés par le réactif au ferricyanure -nitroprussiate et le réactif au diacétyle, le spot U correspondant à l'urée par le réactif d'Ehrlich. le spot C, révélable en violet par le réactif au ferricyanure -nitroprussiate et dont le R_f est de 0,82 dans le solvant E et 0,76 dans le solvant Me-F, nous semble correspondre à la cyanamide.

Le réactif de Pauly révèle 4 taches en rouge (S_2, S_7, S_9, S_{12}) une tache en rouge violacé (S_1) et fait apparaître très fugacement un spot bleu situé légèrement au-dessus de l'intervalle entre S_4 et S_{18}.

Le réactif de MILLON (51) révèle S_1 en jaune et S_7 en orangé.

La ninhydrine révèle faiblement 5 taches : en rose violacé pâle une large tache située près du front et correspondant à un mélange d'ions NH_4^+ et CN^- (*), en violet pâle les taches n_1, n_2 et n_3 et en gris bleuâtre la tache S_{16}.

Nous avons élué les spots visibles en U.V. et effectué leur spectre dans HCl 0,1N et NaOH 0,1N: un seul montre ainsi une absorption importante de la lumière ultra-violette, le spot S_1 (**) (λ max=206 et 292 mμ dans HCl 0,1N et λ max=227 mμ dans NaOH 0,1N)

(*) Les ions CN^- sont révélables en violet par le réactif de WOOD au nitrate d'argent-bleu de bromophénol (143).

(**) Remarquons en outre que le spot S_1 présente un R_f égal à 0,70 dans le solvant Bu-E; après élution de ce spot obtenu sur un chromatogramme migré dans les solvants E puis Bu-E, le spectre d'absorption U.V. est très semblable à celui que nous venons de décrire avec la seule différence que dans NaOH 0,1N il existe deux λ max (=227 et 292 mμ.

Par ailleurs,nous avons évaporé à sec le surnageant:le résidu, de couleur brunâtre,pèse 1,21g(*);après dissolution dans 75ml d'eau distillée chaude, 0,30 g restent insolubles(tableau V: résidu brun insoluble m_1)tandis que dans la solution ,l'urée et la glycine sont dosées:nous avons trouvé 3 m.moles d'urée et seulement des traces de glycine.

Le surnageant ,avant hydrolyse,renferme donc au moins une trentaine de composés organiques:

a)une quantité importante d'acides azulmiques;nous les avons dosés par spectrophotométrie après dissolution dans le diméthyl sulfoxyde (voir deuxième partie,premier chapitre,pour la technique)et pu évaluer ainsi à 0,57 g leur poids représenté dans 1,21 g du résidu sec du surnageant et à 0,27 g dans 0,30 g du résidu brun m_1;

b) de faibles quantités de composés,au nombre d'une vingtaine,visibles en lumière U.V. sur les chromatogrammes, composés que nous n'avons pu déterminer;parmi ceux-ci six pourraient posséder un noyau imidazolique;contrairement à certains auteurs (93,71,72)nous n'avons pu déceler aucun composé purique;

c)un petit nombre de composés d'intérêt biologique de structure relativement simple:urée(en quantité relativement importante),guanidine,glycocyamine et des traces de glycine.

(*)La réaction de Hopkins et Cole effectuée sur ce résidu sec a été negative;cette réaction a été conduite en phase liquide homogène avec lecture spectrophotométrique,selon la technique que nous avons décrite(87).Ce résultat négatif implique donc l'absence de composés à noyau indolique dans le surnageant. Signalons en outre que la réaction de Hopkins et Cole est également négative pour la fraction HIIb de l'hydrolysat du surnageant (tableau V).

B.-Hydrolyse chlorhydrique du surnageant et analyses consécutives.

Le résidu sec du surnageant (1,21 g) est soumis à l'ebullition à reflux dans HCl,6N pendant 24 heures;après refroidissement,on sépare par filtration un précipité brun foncé (tableau V: résidu brun insoluble,m_2)non dissous dans HCl,6N,représentant 9,2 p.100 du poids initial soumis à l'hydrolyse;le filtrat (tableau V:hydrolysat II),de couleur orangée,renferme:

N total :27,75 milli atomes gramme

NH_4^+ :20,00 milli ions gramme

CN^- :1,9 milli ions gramme

N total $-(N_{NH_4^+} + N_{CN^-})$:5,85 milli atomes gramme.

Ce filtrat évaporé à sec laisse déposer 1,683 g de poudre brun clair.Après dissolution dans 80 ml d'eau chaude(0,20g restent insolubles :fraction insoluble NIIa),cet hydrolysat HIIa est passé sur la résine Dowex-2,qui nous a permis de séparer deux fractions:

a)une fraction non retenue,alcaline,incolore,éluée par l'eau,qui,après concentration sous pression réduite,est soumise à la chromatographie bi-dimensionnelle sur papier (Bu-Ac puis Bu-E).Ces chromatogrammes sont assez semblables à ceux obtenus avec la fraction homologue de l'hydrolysat des AAN (non retenue par la résine Dowex-2):on note des spots relativement très importants d'urée et de guanidine;un spot de glycocyamine et un spot d'AICAI;après élution et dosage spectrophotométrique,la quantité d'AICAI contenue dans 1,683 g de l'hydrolysat II a été évaluée à 9,3 µmoles;

b)une fraction renfermant plusieurs amino-acides, éluée par HCl,N (*):cet éluat de couleur jaune orangé,après évaporation,fournit un résidu sec pesant 0,256 g;ce résidu est à son tour dissous dans 25 ml d'eau chaude (là encore la fraction NIIb d'un poids de 35 mg reste insoluble,voir tableau V);sur cette solution HIIb nous pratiquons des chromatographies bi-dimensionnelles sur papier avec les mêmes systèmes de solvants que ceux

(*)Après élution par HCl,N,il reste encore une zone brune fixée sur la résine qu'il est impossible d'éluer.

utilisés pour la solution HIIb provenant de l'hydrolysat des AAN. Les chromatogrammes ainsi obtenus avec cette fraction HIIb sont assez semblables à ceux déjà décrits pour la fraction HIb des AAN: on retrouve le spot T très important et les 11 taches ninhydrine-positives déjà décrites dont 7 correspondent aux amino-acides: glycine (tache la plus importante), ac.aspartique, alanine, histidine, ornithine, thréonine, sérine.

Dans la solution HIIb nous avons en outre dosé l'azote total, l'azote aminé et la glycine. Nous avons enfin soumis cette solution à l'analyse chromatographique sur résine Dowex-50 et les résultats en sont consignés dans le tableau VI.

Tableau VI.

Substances identifiées par chromatographie sur résine Dowex-50(*) et dosées dans l'eluat HCl, fraction HIIb, de l'hydrolysat du surnageant.

(Les résultats sont exprimés en µ atomes-gramme, en µ ions-gramme, en µ moles selon les cas)

Substances	Résultats pour la totalité de la solution HIIb
Azote total	2940
Azote aminé	840
NH_4^+	172
Glycine	504
Ac.aspartique	21
Alanine	16
Histidine	9
Ornithine	5
Ac.γ-amino-butyrique	3,5
Thréonine	3
Lysine	2,7
Sérine	2,5
Ac.glutamique	<1
Urée	2
v_1	12
v_2	9,4
v_3	3

(*) Trois composés ninhydrine-positifs supplémentaires n'ont pu être identifiés: v_1 est élué avant l'ac.aspartique, v_2 et v_3 sont élués à la fin, après l'histidine.

Conclusions du chapitre II.

Après quatre heures de chauffage à 90°C,100ml d'une solution molaire de cyanure d'ammonium permettent de recueillir par filtration 0,814 g d'acides azulmiques sous forme d'un précipité noir et un surnageant qui renferme 0,570g d'acides azulmiques.

Après 24 heures d'hydrolyse par HCl,6N ces deux fractions libèrent de faibles quantités de composés d'intérêt biologique:urée,guanidine,glycocyamine,amino-4-carboxamidine-5-imidazole,amino-acides naturels;le composé d'intérêt biologique le plus abondant est la glycine dont 594 µ moles sont libérées par l'hydrolysat du précipité noir d'acides azulmiques et 504 µ moles par l'hydrolysat du surnageant.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE CERTAINS COMPOSÉS MINÉRAUX SUR LES TRANSFORMATIONS D'UNE SOLUTION AQUEUSE DE CYANURE D'AMMONIUM.

Les composés minéraux présents à la surface de la Terre primitive ont pu influencer les synthèses organiques abiotiques qui se sont produites à leur contact (10,25),en particulier par adsorption à la surface de substances solides (106,107). GOLDSCHMIDT (38) et POWELL (110) ont envisagé une catalyse hétérogène par cristaux,puis SEIFERT (119,120) a observé,pour certains amino-acides,des phénomènes d'"épitaxie"-c'est-à-dire une adsorption spécifique-à la surface des cristaux de quartz.

Par ailleurs,plusieurs auteurs ont étudié l'action catalytique de diverses substances minérales sur les synthèses abiotiques d'amino-acides utilisant l'énergie thermique.

En phase liquide,ORO et coll.(102) ont étudié la formation d'amino-acides à partir d'une solution de paraformaldéhyde et de chlorhydrate d'hydroxylamine dans l'eau entre 80 et 100°C:le molybdate de sodium augmente le rendement à pH acide le vanadate de sodium augmente le rendement à pH basique,alors que le chlorure ferrique a un effet généralement défavorable.

En phase gazeuse,HARADA et FOX (45) ont observé que les silicates améliorent le rendement en amino-acides lorsqu'on chauffe aux environs de 1000°C un mélange de méthane,d'ammoniac et de vapeur d'eau.

Dans le cas de la transformation du cyanure d'ammonium,nous avons étudié la catalyse hétérogène éventuellement apportée par des substances peu solubles dans l'eau et la catalyse homogène par des substances hydrosolubles.Pour cette étude expérimentale,à 100ml de la solution M de NH_4CN,nous ajoutons 0,01 mole de catalyseur minéral finement divisé;le rapport des concentrations molaires:

$$\frac{(\text{catalyseur})}{(NH_4CN)}$$ est égal à $\frac{1}{10}$. Le milieu réaction-

nel est chauffé à 90°C pendant 4 heures;pour les 7 premiers catalyseurs essayés les opérations de fractionnement ont été conduites selon le protocole habituel,décrit pour les expériences ne comportant pas l'adjonction de catalyseurs ;pour 14 autres catalyseurs nous avons adopté un deuxième protocole plus simple et plus rapide que le précédent.Dans tous les cas,les AAN récoltés après filtration,en même temps qu'une partie du catalyseur resté insoluble,ont été dosés par spectrophotométrie (voir dosage).

1°-Résultats enregistrés avec le protocole expérimental habituel.

Six composés minéraux peu solubles dans l'eau ont été utilisés:phosphate tricalcique en poudre,pyrophosphate de calcium en poudre,cristaux de gypse,cristaux de quartz,alumine en poudre,silicate d'alumine en poudre.Nous avons étudié également un composé hydrosoluble,le pyrophosphate de sodium.Les résultats,résumés dans le tableau VII,montrent que le poids d'AAN récoltés en présence des substances minérales n'a jamais été nettement supérieur,à celui obtenu pour le témoin sans catalyseur. La glycine est toujours l'acide aminé de loin le plus abondant parmi ceux qui sont libérés au cours de l'hydrolyse chlorhydrique du surnageant;la quantité de glycine est légèrement supérieure à celle du témoin dans le cas du phosphate tricalcique,du pyrophosphate de calcium,du gypse et du silicate d'alumine;ces molécules modifient l'équilibre réactionnel aux dépens des AAN.

Le pyrophosphate de sodium a un effet catalytique négatif aussi bien vis-à-vis de la formation des AAN que des amino-acides;l'alumine n'apporte qu'un effet inhibiteur modéré.

Les cristaux de quartz ont été les seules substances qui aient augmenté légèrement aussi bien le poids d'AAN que la quantité de glycine mais les autres amino-acides sont diminués par rapport à la préparation témoin.

TABLEAU VII

Influence de catalyseurs minéraux ; protocole expérimental habituel. Tous les chiffres se rapportant à l'hydrolysat sont exprimés en µ atomes gramme ou en µ moles selon les cas et correspondent à la quantité totale de chaque substance.

	AAN (poids en g)	CN⁻ consommés (p.100)	Surnageant Hydrolysat : éluat Dowex-2 par HCl, N				
			$N_{aminé}$ - $N_{NH_4^+}$	Glycine	Ac. aspartique	Alanine	Histidine
Témoin sans catalyseur	0,814	68,8	668	504	21	16	9
CATALYSEURS : Phosphate tricalcique	0,758	62,8	889	589	11	17	8
Pyrophosphate de calcium	0,794	64,6	794	549	16	32	8
Gypse	0,798	64,0	697	546	20	26	8
Quartz	0,822	64,6	704	520	15	13	5
Alumine	0,765	62,8	761	472	11	5	6
Silicate d'alumine	0,786	61,0	725	523	12	13	2
Pyrophosphate de sodium	0,611	59,2	570	248	7	5	< 1

2°-Résultats enregistrés avec le protocole simplifié.

Le surnageant,après dessiccation,a été soumis à l'ébullition à reflux dans HCl,6N pendant cinq heures seulement.Cet hydrolysat est filtré et le filtrat est ensuite évaporé à sec puis repris par l'eau distillée à chaud;nous dosons uniquement la glycine dans cette solution.Un protocole aussi simplifié nous a cependant paru suffisant pour estimer l'activité catalytique des substances minérales vis-à-vis de la transformation du cyanure d'ammonium;nous avons en effet été amené à admettre que la glycine provient elle-même de l'hydrolyse des acides azulmiques du surnageant;il nous est alors apparu que la transformation de NH_4CN que nous étudions est en réalité une transformation principalement azulmique:pour obtenir une estimation approximativement quantitative de cette transformation il nous semble donc qu'il suffise de peser ou de doser les AAN obtenus et de doser la glycine,l'amino-acide de loin le plus abondant résultant de l'hydrolyse des acides azulmiques du surnageant.

Nous avons ainsi étudié les propriétés catalytiques de 14 composés hydrosolubles:molybdate d'ammonium,chlorure cuivrique,chlorure cobalteux,chlorure d'aluminium,chlorure de nickel,chlorure ferrique,anhydride vanadique,chlorure de baryum, chlorure de calcium,chlorure de magnésium,chaux,baryte,chlorure de sodium et carbonate de sodium.

Les résultats sont consignés dans le tableau VIII.

Certaines substances minérales exercent une catalyse nettement négative sur la transformation azulmique du cyanure d'ammonium:il en est ainsi du chlorure ferrique,du chlorure de nickel,du chlorure cobalteux,de l'anhydride vanadique,du chlorure d'aluminium,du chlorure cuivrique,du molybdate d'ammonium.

D'autres substances minérales présentent un effet inhibiteur modéré:le carbonate de sodium,la chaux,la baryte;on peut admettre que cette légère inhibition est en relation avec une légère augmentation du pH du milieu réactionnel amenée par ces composés basiques.

L'adjonction de certains composés minéraux ne semble

TABLEAU VIII

Influence de catalyseurs minéraux : protocole simplifié

		AAN (poids en g)	CN- consommés p.100	Surnageant Glycine en µ moles (quantité totale dans l'hydrolysat du surnageant)
Témoin sans catalyseur		0,814	68,8	386
CATALYSEURS	Molybdate d'ammonium	0,430	64	337
	Chlorure cuivrique	0,345	79,6	285
	Chlorure cobalteux	0,032	79,6	375
	Chlorure d'aluminium	0,282	80,8	412
	Chlorure de nickel	0,165	76	212
	Chlorure ferrique	0,135	85	189
	Anhydride vanadique	0,225	58	75
	Chlorure de Baryum	0,850	73	391
	Chlorure de calcium	0,685	71,8	562
	Chlorure de magnésium	0,550	70,6	549
	Chaux	0,662	69,4	387
	Baryte	0,661	66,4	415
	Chlorure de sodium	0,990	68,2	369
	Carbonate de sodium	0,705	61	225

pratiquement pas influencer la transformation azulmique;c'est le cas du chlorure de sodium,du chlorure de magnésium,du chlorure de calcium;dans ce dernier groupe notons que le chlorure de magnésium et le chlorure de calcium font augmenter la quantité de glycine dans l'hydrolysat -c'est -à-dire la quantité d'acides azulmiques du surnageant- au détriment de la quantité d'ΛΛN,alors que le chlorure de sodium a un effet inverse.

Seul le chlorure de baryum a augmenté très légèrement et conjointement le poids d'ΛΛN et la quantité de glycine.

Conclusions du chapitre III.

L'adjonction de substances minérales solubles ou peu solubles,à la solution aqueuse de cyanure d'ammonium,ne nous a pas parmis d'observer de nettes augmentations de la transformation azulmique ou du rendement en substances d'intérêt biologique;parmi 21 composés minéraux étudiés seuls les cristaux de quartz et le chlorure de baryum ont manifésté une activité très légèrement positive.

D E U X I E M E P A R T I E

LES ACIDES AZULMIQUES OBTENUS A PARTIR DU CYANURE D'AMMONIUM.

Nous nous sommes livré à une étude plus approfondie des acides azulmiques lorsqu'à l'issue de nos premières séries d'expériences, il était devenu pour nous évident que la plupart des composés d'intérêt biologique obtenus à partir du cyanure d'ammonium en milieux aqueux provenaient en réalité de l'hydrolyse chlorhydrique des acides azulmiques, eux-mêmes produits principaux des réactions de polymérisation de NH_4CN.

Dans cette deuxième partie, qui à nos yeux constitue la partie la plus originale de notre travail dans le cadre de l'évolution moléculaire, nous décrirons nos recherches sur les acides azulmiques noirs recueillis sous forme d'un précipité et d'autre part sur les acides azulmiques qui s'insolubilisent progressivement à partir du surnageant.

CHAPITRE PREMIER

LES ACIDES AZULMIQUES NOIRS

Malgré certains essais d'utilisation des AAN par l'agriculture comme engrais azotés(53,131,39) et par l'industrie comme agents dispersants ou comme colorants (84,137),la production des polymères azulmiques est encore considérée comme indésirable surtout lors de la préparation et de la conservation du monomère,l'acide cyanhydrique.La mise au point la plus récente sur les acides azulmiques est celle de VOLKER qui date de 1960.C'est en 1963 qu'à la suite des travaux de ORO et coll. (93,95,96,99-101)puis de LOWE et coll.(71,72),l'intérêt théorique des acides azulmiques noirs est apparu dans le cadre de l'évolution moléculaire pré-biologique;nos propres recherches ont suivi cette orientation.

Nous rapportons ici nos résultats expérimentaux concernant uniquement les acides azulmiques noirs (AAN) recueillis sous la forme d'un précipité, après 4 heures de chauffage à 90°C, puis refroidissement d'une solution molaire de cyanure d'ammonium.

I. -Propriétés physico-chimiques des acides azulmiques noirs.

Il s'agit d'une poudre noire amorphe non hygroscopique dont le point de fusion est supérieur à 350°C.

1°. -Caractères de solubilité.

Les AAN sont très peu solubles dans l'eau et les solvants organiques classiques,assez solubles dans la soude diluée,l'acide formique et l'acide sulfurique concentré ,légèrement solubles dans l'urée 10M,l'ammoniaque concentrée et le

phénol aqueux;leur meilleur solvant semble être le diméthylsulfoxyde (DMSO)(*):celui-ci nous a permis de faire le spectre d'absorption en lumière visible et ultra-violette et de tester le comportement chromatographique et électrophorétique des AAN.

2° - Analyse élémentaire.

L'analyse élémentaire de divers échantillons d'AAN nous a donné la composition centésimale moyenne suivante:

C=38,77; H=3,96 ; N=40,85; O=16,42.

D'après VÖLKER (137) l'oxygène ne vient pas de l'air,mais il provient de l'eau.

Les AAN sont donc des composés riches en carbone et en azote.

3° - Masse moléculaire.

VÖLKER (137)a effectué deux préparations d'AAN par chauffage à 50°C d'une solution aqueuse contenant NH_4OH et un gros excès de HCN:le premier échantillon aurait pour masse moléculaire 443 et pour formule brute $C_{15}H_{17}O_4N_{13}$,le second 497 et $C_{17}H_{19}O_4N_{15}$.

VARNER et BURRELL (133) ont chauffé à 100°C une solution aqueuse de HCN et ont récolté un AAN de formule brute $C_7H_6N_6O_2$ (M=206);une solution de cyanogène traitée dans les mêmes conditions leur a donné un AAN de formule brute $C_6H_6N_6O_2$ (M=194).

De notre côté nous ne proposons aucune masse moléculaire pour nos AAN;en effet nous avons essayé d'effectuer des mesures cryoscopiques de masse moléculaire sur des solutions d'AAN dans le diméthylsulfoxyde:plusieurs mesures nous ont permis d'obtenir des masses moléculaires relativement faibles,comprises entre 70 et 100,mais nous ne pouvons tenir aucun compte de ces résultats car nos solutions d'AAN doivent contenir de petites molécules venant perturber les mesures cryoscopiques(ions NH_4^+,produits d'oxydation des AAN par le solvant...).Enfin,des mesures de masse moléculaire par photo-goniodiffusométrie sur des solutions d'AAN dans le DMSO ont été impossibles par le fait qu'aux concentrations requises pour une bonne évaluation de la masse moléculaire,les AAN en

(*)Le DMSO présente cependant l'inconvénient d'avoir certaines propriétés oxydantes (55).

solution absorbent trop la lumière (*).

4° - Spectre d'absorption de la lumière ultra-violette et dosage des AAN.

Une solution d'AAN, dans le DMSO à 0,2 mg/ml présente un maximum d'absorption à λ =252 mμ (pH=9) en cuve de 1mm d'épaisseur, le solvant pur étant pris comme blanc (spectrophotomètre UNICAM SP 800).

Nous avons mis au point un dosage spectrophotométrique des AAN en solution dans le DMSO; en effet, dans la gamme de concentrations s'étendant entre 0,1 et 0,4mg par ml, la densité optique à λ =252mμ suit sensiblement la loi de Beer-Lambert. Le protocole expérimental du dosage que nous avons mis au point est le suivant;

a) gamme témoin: nous pesons sur une balance de précision respectivement 2,5mg, 5 mg, et 7,5mg d'AAN soigneusement lavés à l'eau distillée puis séchés et réduits en poudre fine; chaque échantillon est déposé dans un tube à essais rodé, puis on ajoute dans chaque tube 20ml de DMSO; les 3 tubes sont bouchés soigneusement (**) et agités simultanément dans un bain-marie à 60°C pendant deux heures; puis, après un séjour de 3 heures à l'obscurité à 20°C, la densité optique de chaque solution est mesurée sous 1mm d'épaisseur, le solvant pur étant pris comme blanc dans une cuve de même épaisseur ; la densité optique des solutions en fonction de leur concentration en AAN est rapportée sur la figure 4 (spectrophotomètre UNICAM SP 500);

(*) Nous remercions vivement MM. DUCASTAING et ULIANA qui ont effectué ces essais dans le laboratoire de Monsieur le Professeur CREAC'H.

(**) Il importe de ne pas laisser entrer de vapeur d'eau dans les tubes: en effet le DMSO fixe très facilement de l'eau et alors la solubilité des AAN dans le DMSO diminue rapidement lorsque son hydratation augmente.

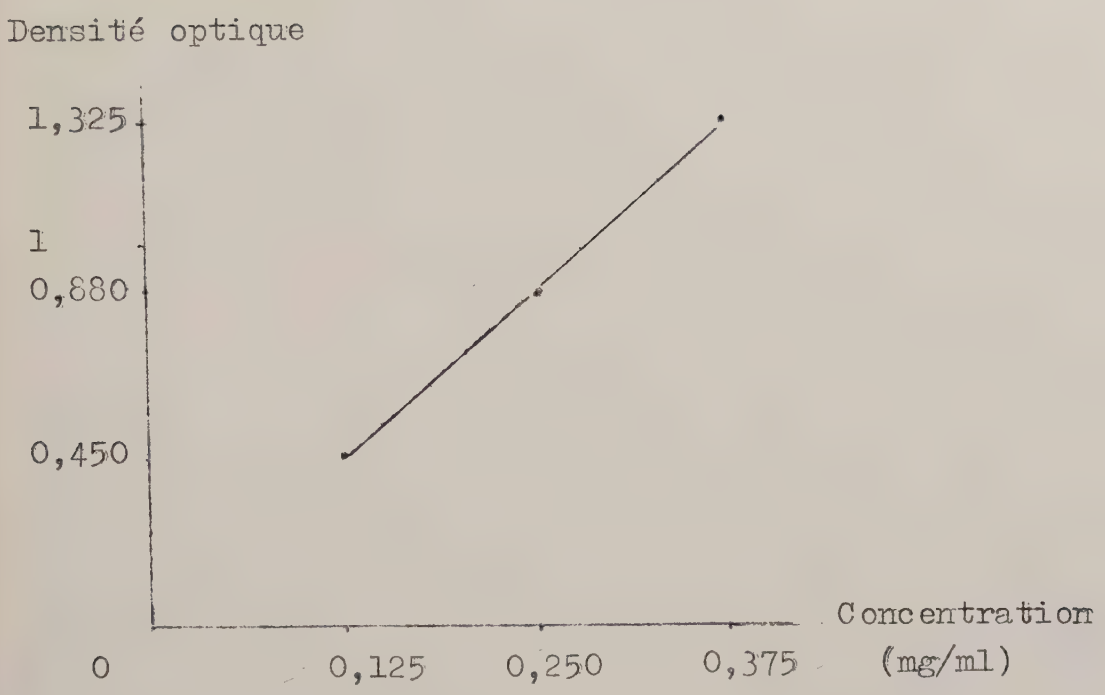


Fig.4 – Densité optique de solutions d'AAN dans le DMSO à λ =252mμ(cuves de silice de 1mm d'épaisseur).

b) échantillons à doser: chaque échantillon est desséché puis réduit en poudre fine;une partie aliquote est pesée de façon que le poids d'AAN qu'elle renferme soit compris entre 2 et 8mg; chaque échantillon à doser est dissous dans 20ml de DMSO et traité de la même manière et en même temps que les échantillons de la gamme;en portant la densité optique de chaque solution à doser sur la droite établie à l'aide de la gamme ,on lit la concentration.

5° - Spectre infra-rouge.

Les AAN en poudre,après inclusion dans KBr, offrent un spectre I.R. difficile à interpréter;cependant,le spectre possède d'une manière nette une bande à 1640 cm^{-1} correspondant à la liaison C=O;mais aucune bande absolument caractéristique de la liaison peptidique n'est visible(cf. spectre inférieur de la figure 6).

6° - Spectre de diffusion des rayons X.

Le spectre de diffusion des rayons X par les AAN en poudre a été obtenu par la méthode de Debye-Scherrer: ce spectre est celui d'un composé amorphe et présente un anneau correspondant à une période de 3,28Å,ce qui serait en accord avec la structure polymérique des AAN.

7° - Comportement chromatographique et électrophorétique.

En raison de la faible solubilité du précipité noir nous avons eu de grandes difficultés pour faire cette étude.

a)Essais de chromatographie.

En chromatographie descendante sur papier Whatman 3MM nous n'avons pu observer de migration à peu près acceptable qu'avec la phase solvante suivante:DMSO,NH_4OH concentré(d=0,9), eau (90:5:5,v/v);on observe alors un spot allongé de R_f=0,66.

Sur couche mince de gel de silice G Merck(Kieselgel), les résultats ont été encore plus mauvais.

Sur colonne de Sephadex LH-20 et avec le DMSO pur comme phase solvante nous avons observé une bande brune traînante;d'ailleurs le DMSO semble détériorer plus ou moins ce type de Sephadex.

b)Electrophorèse.

Sur papier Schleicher et Schull 2043b nous avons fait les essais suivants :

.tampon de pH=9,7 constitué par :DMSO,NH_4OH(d=0,9), HCOOH,4N(85:10:5,v/v);pas de migration sous 20 volts/cm.

.tampon de pH=6 constitué par:DMSO,NH_4OH(d=0,9), HCOOH pur,eau (85:2:10:3,v/v);légère migration vers le pôle négatif sous 20 volts/cm.

Sur bande d'acétate de cellulose "cellogel" et dans une solution aqueuse de HCOOH,0,5N,de pH=2,05 nous avons obtenu une nette migration vers le pôle négatif sous 20 volts/cm.

Sur couche mince de gélose il nous a été pratiquement impossible d'observer une migration car les AAN dissous dans le DMSO précipitent dès qu'ils sont déposés sur la gélose.

En milieu acide ,les AAN semblent donc se comporter comme des cations,leurs fonctions azotées étant alors ionisées.

II. - Analyse chimique des acides azulmiques noirs.

En plus de l'hydrolyse chlorhydrique rapportée au chapître II de la première partie,nous avons soumis les AAN à une hydrolyse chlorhydrique ménagée,à une hydrolyse par la baryte et à des hydrolyses enzymatiques.Nous avons en outre effectué un dosage des groupements $-NH_2$ par polarographie et étudié l'action du dinitrofluorobenzène sur les AAN.

A.- Hydrolyse chlorhydrique ménagée.

Les AAN (0,814 g),obtenus à partir de 100ml de NH_4CN,M ont été chauffés à 100°C pendant 7 heures dans HCl,6N. La fraction non retenue par la résine Dowex-2 ne renferme alors que 4,5 µmoles d'AICAI,la fraction HIb renferme des quantités moindres de chaque amino-acide par rapport à celles du tableau IV :109 µmoles pour la glycine,1,65 µmoles pour l'acide aspartique,0,043 µmoles pour l'alanine.

B. - Hydrolyse par la baryte.

Un nouvel échantillon d'AAN (0,814 g) est soumis à l'ébullition à reflux dans une solution aqueuse de $Ba(OH)_2$ 0,2N pendant 24 heures;après refroidissement on élimine par filtration un résidu noirâtre insoluble (*),abondant qui, lavé et séché,représente 71p.100 du poids initial .Ce résidu en solution dans le DMSO présente encore une absorption maximum à λ=252 mµ.Le filtrat est alors saturé en CO_2 par barbottage pour précipiter l'excès de baryte sous forme de carbonate qui est à son tour éliminé par filtration .Le dernier filtrat,après concentration sous pression réduite,est alors soumis à l'analyse chromatographique.

a) Chromatographie bi-dimensionnelle sur papier (avec les systèmes solvants Bu-Ac,puis Bu-P):la révélation à la ninhydrine ne fait apparaître que deux taches dont la plus importante

(*)Le dosage des AAN après dissolution de ce résidu dans le DMSO montre qu'il est constitué de 80p.100 d'AAN.

correspond à la glycine et l'autre à l'alanine;nous avons identifié en outre une tache d'urée et une tache de guanidine.

b) Chromatographie sur colonne de résine Dowex-50:en plus des ions NH_4^+,nous n'obtenons pratiquement que trois pics ninhydrine -positifs et correspondant respectivement à la glycine((52 µmoles),l'alanine(10,9µmoles) et l'urée (0,3 µmoles).

On ne peut attribuer la pauvreté en amino-acides de l'hydrolysat baryté à une destruction de ces composés par une ébullition trop prolongée en milieu basique car,à l'issue de 4 heures ou même d'une heure d'ébullition,nous n'avons observé là encore que la formation de la glycine et de l'alanine;on peut remarquer en outre que la glycine apparaît progressivement puisque 3,25 µmoles sont libérées à l'issue de la première heure, 23,5 µmoles à l'issue de la quatrième heure et 52 µmoles en 24 heures.

C. -Essais d'hydrolyses enzymatiques

Les AAN libèrent des amino-acides naturels lorsqu'on les soumet à l'hydrolyse chimique en milieu acide ou basique et pourtant,d'après leur spectre I.R. ,ces polymères ne semblent pas renfermer de liaisons peptidiques.Nous avons donc voulu connaître l'action de certains enzymes hydrolytiques sur les AAN.

Signalons d'emblée que nous avons été obligé d'opérer en milieu hétérogène,avec des AAN réduits en poudre fine en raison de la très faible solubilité des AAN dans l'eau.

Nous avons utilisé quatre enzymes protéolytiques et l'uréase:

-pepsine (pour usages biochimiques à 35 000u/g,Merck-Darmstadt)
-trypsine(pour usages biochimiques à 20 000u/g,Merck-Darmstadt)
-papaïne(pour usages biochimiques à 60 000u/g,Merck-Darmstadt);
-pronase (B grade,Calbiochem);
-uréase(à 250 000 u/g,Merck-Darmstadt).

1° -Action des enzymes protéolytiques.

Les diverses préparations sont agitées sur une table basculante,elle-même placée dans une étuve à 37°C.

Pour étudier l'action de chaque enzyme nous avons

préparé simultanément trois milieux réactionnels aqueux d'un volume final de 10ml:

1. -milieu réactionnel complet (I),renfermant l'enzyme, le substrat constitué par une fine suspension d'AAN dans une solution,tamponnée ou non,de pH bien déterminé;

2. -milieu témoin (II)ne différant du mélange n°1 que par l'absence du substrat;

3. -deuxième milieu témoin (III)ne différant du mélange n°1 que par l'absence de l'enzyme.

Ce protocole expérimental est détaillé dans le tableau IX.

Après 24 heures d'incubation les milieux I et III sont centrifugés;puis les surnageants et le milieu II sont soumis à la chromatographie bi-dimensionnelle sur papier Whatman 3MM (dépôt de 0,5 ml)avec le couple de phases solvantes Bu-Ac puis Bu-P.

Après révélation par une solution acétonique de ninhydrine à 0,5 p.100 nous n'avons pu mettre en évidence aucune tache ninhydrine positive objectivant une attaque des AAN par les enzymes mentionnés ci-dessus.

N'étant pas attaqués par les enzymes protéolytiques classiques les AAN ne doivent pas renfermer de liaisons peptidiques;nous confirmons donc les résultats apportés par la spectroscopie infra-rouge.

2° - Action de l'uréase.

Au cours de l'hydrolyse chlorhydrique ou barytée les AAN libèrent de faibles quantités d'urée;aussi avons-nous cherché à connaître l'action de l'uréase sur les AAN.

Nous avons adapté la technique décrite par DEBRIS (20). Le mélange réactionnel de pH=6,4 est constitué par une solution aqueuse d'uréase (0,16 mg/ml) dans laquelle on met en suspension une fine poudre d'AAN(1,6 mg/ml).Trois milieux témoins sont réalisés:

-le témoin 1 est constitué par la solution aqueuse d'uréase;

-le témoin 2 par la suspension d'AAN dans l'eau;

-le témoin 3 est préparé en deux temps:une suspension d'AAN dans l'eau distillée (1,6 mg/ml) est agitée à 37°C pendant une heure,puis filtrée;ensuite ce filtrat sera incubé en présence

TABLEAU IX

Essais d'hydrolyse des acides azulmiques noirs par certains enzymes protéolytiques.

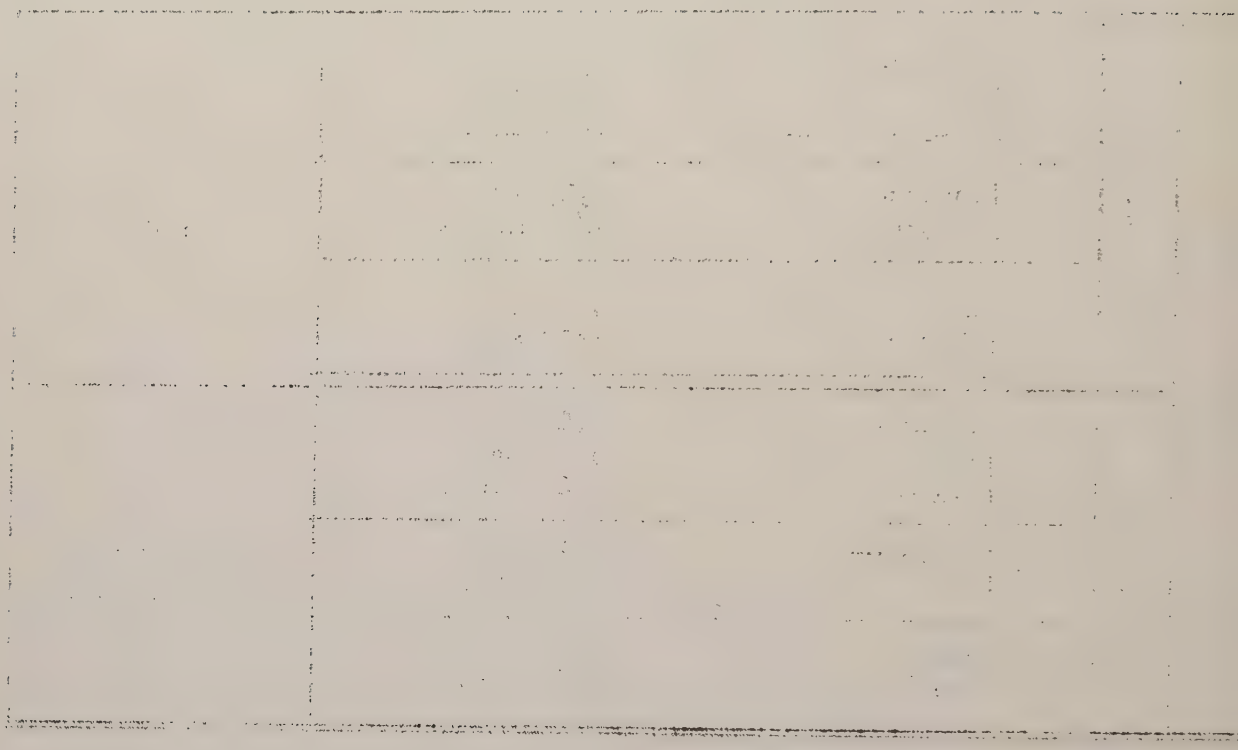
Enzyme	Milieux réactionnels		
		Concentrations finales par ml	pH
Pepsine	I	Pepsine 0,5 mg AAN 5 mg Ac. acétique 0,1 mmole	2,8
	II	Pepsine 0,5 mg Ac. acétique 0,1 mmole	
	III	AAN 5 mg Ac. acétique 0,1 mmole	
Trypsine	I	Trypsine 0,5 mg AAN 5 mg $Ca(NO_3)_2$ 10 µmoles	ajusté à 7,6 par addition de NaOH
	II	Trypsine 0,5 mg $Ca(NO_3)_2$ 10 µmoles	
	III	AAN 5 mg $Ca(NO_3)_2$ 10 µmoles	
Papaïne	I	Papaïne 0,5 mg AAN 5 mg Tampon phosphaté de Soerensen (P.S.) 1/30 mmole KCN 5 mg	7,0
	II	Papaïne 0,5 mg Tampon P.S. 1/30 mmole KCN 5 mg	
	III	AAN 5 mg Tampon P.S. 1/30 mmole KCN 5 mg	

TABLEAU IX (suite)

onase	1er essai	I	Pronase AAN Tampon P. S.	0,25 mg 5 mg 1/30 mmole
		II	Pronase Tampon P. S.	0,25 mg 1/30 mmole
		III	AAN Tampon P. S.	5 mg 1/30 mmole
	2e essai	I	Pronase AAN NH_4Cl	0,25 mg 5 mg 0,2 mmole
		II	Pronase NH_4Cl	0,25 mg 0,2 mmole
		III	AAN NH_4Cl	5 mg 0,2 mmole

7,0

ajusté à 7,8 par addition de NaOH



d'uréase pour constituer réellement le témoin 3.

Dans un bain-marie à 37°C on laisse incuber sous agitation pendant une heure le milieu réactionnel complet et les trois milieux témoins .Ala fin de l'opération les milieux renfermant une suspension d'AAN sont soumis à une centrifugation afin d'éliminer les particules solides.

Dans chacun des quatre milieux on dose alors les ions NH_4^+ par le réactif de Nessler;dans le cas où l'action de l'uréase s'est exercée sur la suspension d'AAN (milieu réactionnel complet) on met en évidence l'apparition de faibles quantités d'ions NH_4^+ mais on s'aperçoit qu'une quantité équivalente de cet ion a spontanément pris naissance dans le témoin 3.

L'action de l'uréase apparaît donc nulle.

D. - Essais de mise en évidence de groupements aminés libres.

Sur les AAN réduits en poudre finement divisée nous avons dosé les groupements $-NH_2$ par polarographie et étudié l'action du 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB).

a)-Dosage des groupements $-NH_2$.

Nous avons utilisé la méthode polarographique décrite par JENSEN et LAROUDE (50),méthode qui ne dose pas les ions NH_4^+; 814 mg d'AAN renferment 525 µ atomes gramme d'azote aminé.

b)-Action du 2,4-dinitrofluorobenzène.

Les AAN étant insolubles dans l'eau nous avons utilisé la technique de SANGER (118) adaptée en milieu hétérogène pour les scléroprotéines insolubles par BISERTE et coll.(12); 100 mg d'AAN ont été agités à l'obscurité et à température ordinaire pendant 48 heures dans la solution hydro-alcoolique suivante:5 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 10p.100 additionnée de 10ml d'une solution dans l'éthanol de DNFB à 5p.100 (v/v);au bout de 24 heures nous avons encore ajouté au milieu réactionnel 2,5 ml de solution de $HNaCO_3$ et 5 ml de solution de DNFB.Après 48 heures de contact ,les AAN sont séparés sur filtre ,lavés successivement à l'eau distillée ,à l'éthanol

absolu puis à l'ether exempt de peroxydes;on obtient alors 190mg de poudre sèche noirâtre qui sont ensuite soumis à une hydrolyse de 24 heures par ébullition à reflux dans HCl,6N;l'hydrolysat est ensuite filtré:on sépare ainsi un précipité noirâtre insoluble dans HCl (ce précipité lavé puis desséché pèse 47 mg) d'un filtrat orangé qui est concentré ensuite sous pression réduite puis additionné d'eau de façon à obtenir une liqueur d'acidité à peu près N;cette liqueur est soumise à 4 extractions par l'éther exempt de peroxydes,puis à 4 extractions par l'acétate d'éthyle, enfin elle est évaporée à sec.

Nous obtenons ainsi 3 fractions:

-les extraits éthérés sont réunis,lavés 3 fois à l'eau puis évaporés à sec et enfin repris par 1ml d'acétone,

-les extraits par l'acétate d'éthyle sont réunis puis évaporés à sec et enfin repris par 1 ml d'acétone,

-le résidu sec de la phase aqueuse chlorhydrique est repris par 5ml d'acétone:il apparaît un léger précipité qu'on élimine par filtration;cette solution acétonique est concentrée ensuite à 1 ml.

200 µl de chacune des trois fractions acétoniques ont été soumis à la chromatographie descendante sur papier Whatman 3MM (phase solvante Bu-E)parallèlement avec des témoins de DNP-amino-acides (Mann):DNP-glycine,DNP-L-alanine ,ac. DNP-L-aspartique, di-DNP-L-histidine,DNP-delta-L-ornithine,N-epsilon-mono-DNP-L-lysine(HCl).Après développement nous n'avons noté aucune tache jaune pouvant correspondre à quelques DNP-amino-acides libérés par les AAN;seules étaient présentes les taches du DNFB et de ses produits de dégradation(2,4-dinitrophénol et dinitraniline).

Nous pouvons donc admettre que les AAN ne renferment que très peu de groupements $-NH_2$ libres.

III. - Action de certains micro-organismes sur les acides azulmiques noirs.

L'utilisation biologique éventuelle des AAN n'a donné lieu qu'à très peu de travaux ;leur production industrielle a été envisagée pour l'agriculture comme engrais

(53,131,39)mais l'azote qu'ils renferment n'est assimilé que très lentement par les plantes (53):il est probable que cette assimilation soitun processus secondaire à l'attaque des AAN par les bactéries du sol (53).

Nous avons déjà souligné la richesse des AAN en carbone (C:38,77p.100) et en azote (N:40,85 p.100);d'autre part les AAN ne semblent pas attaqués par les enzymes protéolytiques classiques et pourtant leur hydrolyse chimique en milieu basique ou acide libère des amino-acides;ces propriétés particulières nous ont incité à étudier l'utilisation des AAN comme source d'azote et de carbone,par divers micro-organismes appartenant aux groupes des bactéries,des champignons inférieurs et des algues vertes d'eau douce (*).

1°- Techniques

Nous avons utilisé quatre espéces de bactéries,une d'actino-mycètes,cinq de levures,cinq de champignons filamenteux unicellulaires, et deux d'algues vertes dont le nom et l'origine figurent dans le tableau XI.

Les cultures sont effectuées sur milieux solides, en tubes inclinés de gélose à 2p.100(Bacto-agar Difco).Les milieux de culture sont réalisés à partir de solutions aqueuses de sels minéraux ne contenant ni azote,ni carbone,variables selon les groupes de micro-organismes (tableau X) et enrichies, selon les expériences,de sels azotés minéraux ou bien de composes glucidiques qui serviront de source carbonée (tableau X) ou encore de facteurs de croissance dans le cas de S. cerevisiae et S. Boulardii.La gélose est ensuite incorporée à chaud.

Chaque espèce est ensemencée simultanément sur cinq milieux:

Milieu 1:milieu minéral,variable suivant le groupe de micro-organismes ,enrichi en azote minéral et en glucides;ce premier milieu,qui sert de témoin,permet de contrôler que chaque souche est capable de se développer sur le milieu synthétique azoté et carboné.

Milieu 2:milieu précédent additionné d'AAN finement pulvérisés (10 g/l),que l'on incorpore à chaud et sous agitation;nous

(*)Nous remercions vivement MM.BAUTE,TANNER,VERNET et LAINE qui nous ont aimablement procuré certaines souches.

TABLEAU X

Composition des milieux de culture en substances minérales; les chiffres indiquent la concentration finale en m.moles par litre; la concentration en chaque oligo-élément est de 0,2 µ atome-gramme/l.

téries		Levures		Champignons et Actinomycètes		Algues (*)	
O_4	3,9 } **	KH_2PO_4	7,35	K_2HPO_4	5,7	Na_2HPO_4	0,35
PO_4	6 }						
₂	0,2	$CaCl_2$	0,09			$CaCl_2$	0,36
₄	0,81	$MgSO_4$	0,81	$MgSO_4$	2	$MgSO_4$	0,02
		$FeCl_3$	0,037	$FeSO_4$	0,036	$FeCl_3$	0,073
				KCl	6,6	KI	0,003
						NaCl	0,85
						NaBr	0,007
						HCl	0,24
go-éléments		Oligo-éléments					
Zn,Co,Cu,Mo)		(Mn,Zn,Co,Cu,Mo)					
H = 7		pH = 5,1		pH = 7,3		pH = 6,3	
Substances ajoutées éventuellement comme source d'azote							
)₂ SO_4	51	$(NH_4)_2SO_4$	51	$NaNO_3$	35	$NaNO_3$	0,12
H_2PO_4	6,9	$NH_4H_2PO_4$	6,9			NH_4NO_3	0,062
						KNO_3	0,1
Glucides ajoutés éventuellement comme source de carbone							
cose	27,7	Glucose	27,7	Saccharose	29,2	Glucose	27,7

*) Pour la culture des algues nous utilisons de l'eau de source stérilisée, pour les autres micro-organismes nous utilisons de l'eau distillée stérile.

**) Tampon phosphaté de Soerensen $\frac{M}{15}$, pH = 7 ; 150 ml pour 1 l de milieu.

TABLEAU XI

Croissance de micro-organismes en présence d'AAN.

MICROORGANISMES UTILISES		CROISSANCE		
Espèces	Souches et origine	Milieu 3 : AAN unique source de N	Milieu 4 : AAN unique source de C	Milieu 5 : AAN source de C et de N
Bacillus subtilis	L.T.	+	+	+
Bacillus megatérium	La 265 F.M.L.	++	+	+
Pseudomonas aeruginosa	A_{237} I.P.P.	+++	+	±
Micrococcus flavus	53160 I.P.P.	+	+	+
Nocardia asteroïdes	(Eppinger) Blanchard C.B.S.	0	0	0
Saccharomycès cerevisiae	L.M.	++	±	±
Saccharomycès Boulardii 17	L.B.	++	+	+
Candida pelliculosa	Red. C.B.S.	+++	+	+
Candida lipolytica	(Harrison) Diddens et Lodder C.B.S.	++	+	+
Candida albicans	L.B.P.	++	+	+
Penicillium notatum	L.B.P.	++++	++	++
Penicillium digitatum	L.B.P.	++++	++	++
Aspergillus fumigatus	Fres. C.B.S.	+++	++	++
Aspergillus versicolor	(Vuill.) Tiraboschi C.B.S.	++++	+	+
Aspergillus niger	V. Tieghem C.B.S.	+++	+	±
VERTES Chlorella vulgaris	211-11 h P.V.G.	0	±	0
Chlorella pyrenoïdosa	211- 8 b P.V.G.	±	±	±

Légende du TABLEAU XI

Le nombre de croix indique l'importance des colonies à la surface des milieux solides.

Origine des souches:

F. M. L. : Faculté de Médecine de Lausanne
I. P. P. : Institut Pasteur de Paris
C. B. S. : Centraal bureau voor Schimmelcultures, Baarn (Pays-Bas)
L. B. P. : Laboratoire de Botanique de la Faculté de Pharmacie de Bordeaux
P. V. G. : Institut de Physiologie végétale de Göttingen (Allemagne)
L. T. : Laboratoire Toraudé (Paris)
L. M. : Laboratoire Millot (Paris)
L. B. : Laboratoire Biocodex (Paris).

obtenons ,après refroidissement,une fine suspension solide de couleur noire;ce deuxième milieu témoin nous permet de rechercher l'inhibition éventuelle de la croissance apportée par les AAN.
Milieu 3: milieu 2 où l'azote minéral est supprimé;l'azote organique constitutif des AAN représente la source azotée.
Milieu 4 :milieu 2 sans glucides,la source carbonée glucidique étant remplacée par le carbone organique des AAN.
Milieu 5 :milieu 2 sans azote minéral ni glucides,les AAN constituant en même temps la source azotée et carbonée.

Les cultures sont incubées à l'étuve à 27°C;seules les algues sont cultivées à la température du laboratoire et à la lumière du jour.

L'importance des colonies à la surface des milieux solides est généralement notée quatre jours après l'ensemencement sauf pour les champignons (21 jours);nous avons donné conventionnellement la valeur ++++ au temoin n°1 pour chaque espèce.

2°-Résultats et discussion

La comparaison des cultures dans les milieux 1 et 2 montre que,parmi les 17 souches examinées,trois seulement ont leur croissance inhibée par les AAN:pour Nocardia asteroïdes l'inhibition est totale;elle est presque complète pour Chlorella pyrenoïdosa et C.vulgaris.

La croissance des souches en présence d'AAN est répertoriée dans le tableau XI.D'une façon générale,les AAN représentent une meilleure source d'azote que de carbone (*).

Les espèces qui semblent les plus aptes à utiliser le carbone et l'azote des AAN appartiennent au groupe des champignons filamenteux.

Bien que présentant une forte teneur en C et N,les AAN semblent constituer une source nutritive organique assez difficilement utilisable par la plupart des micro-organismes que nous avons étudiés;pourtant plusieurs espèces citées ici se sont montrées capables d'utiliser des hydrocarbures saturés, éthéniques ou aromatiques comme source carbonée:Candida lipoly-

(*)Remarquons que dans tous les cas CO_2 et N_2 atmosphériques constituent encore des sources éventuelles d'azote et de carbone.

tica (33,16,78,74),Pseudomonas aeruginosa (33,74),Nocardia(33,74) Aspergillus versicolor (33),certaines espèces de Penicillium(33).

Nous devons donc admettre que la structure chimique des AAN est assez résistante à l'attaque par la plupart des espèces que nous avons choisies;il n'en reste pas moins que Penicillium notatum,Penicillium digitatum et Aspergillus fumigatus semblent capables de dégrader et d'assimiler les AAN.

Il est intéressant de rapprocher nos résultats de ceux obtenus par FOX et HARADA (30) avec les "protéinoïdes" préparés par thermopolymérisation des amino-acides,polymères dont on a montré la valeur nutritive pour Lactobacillus arabinosus.Protéinoïdes et acides azulmiques revêtent une importance semblable dans le cadre de l'évolution pré-biologique.

IV. - Propriétés catalytiques des acides azulmiques noirs.

VOLKER (138)a montré que les AAN peuvent fixer réversiblement certains métaux précieux (Pt,Au) sans que des liaisons ioniques soient mises en jeu.D'autre part,par leur mode de formation et d'après leur faculté de donner naissance à des composés d'intérêt biologique,les AAN peuvent être considérés, avons-nous vu,comme des étapes importantes de l'évolution pré-biologique (63).Nous avons donc cherché à faire de ces polymères des modèles de métallo-enzymes primitifs:ceci nous a conduit à étudier d'éventuelles propriétés catalytiques des AAN-en présence ou en absence de divers sels métalliques - vis-àsvis de réactions biochimiques.

Nous avons étudié l'action catalytique des AAN en présence ou en absence de sels métalliques,vis-à-vis de dix réactions biochimiques.Signalons que pour certaines d'entre elles FOX et coll.(29) ont montré que des "protéinoïdes",préparés par thermo-condensation des amino-acides naturels,ont une action catalytique.

1.Protocole expérimental.

Ici encore nous avons été obligé d'opérér en milieu hétérogène ,avec des AAN réduits en poudre fine,en raison

de la très faible solubilité des AAN dans l'eau.

Toutes les réactions ont été effectuées sous agitation au bain-marie à 37°C.

Dans les cas où nous avons recherché une éventuelle action catalytique des AAN seuls, la réaction est effectuée dans un milieu réactionnel complet, c'est-à-dire constitué par les substrats, les AAN et certains adjuvants énumérés tableau XII, et contrôlée par deux témoins qui diffèrent respectivement du milieu complet par l'absence des substrats ou l'absence des AAN.

La catalyse d'autres réactions a été étudiée en présence d'AAN et de sels métalliques co-catalyseurs (*): le milieu réactionnel complet renferme alors les substrats, les AAN, le co-catalyseur et certains adjuvants; le contrôle est apporté par trois témoins qui diffèrent respectivement du milieu complet par l'absence du co-catalyseur, l'absence des AAN ou bien l'absence des deux agents précédents.

Nous avons rassemblé dans le tableau XII les conditions opératoires choisies pour chaque réaction.

2. Résultats.

Les résultats ont été négatifs pour six réactions: décomposition de l'eau oxygénée, désamination de l'adénine, hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium, transformation de D-glucose, décarboxylation du pyruvate de sodium, hydrolyse de l'arginine (**); en effet nous n'avons pu mettre en évidence de transformations des substrats aussi bien dans le milieu réactionnel complet que dans les témoins correspondants.

La réaction de transamination a été légèrement catalysée par les ions Al^{3+}, phénomène bien connu; la présence d'AAN n'a apporté ni augmentation ni diminution de l'activité catalytique des ions Al^{3+}; en l'absence d'ions Al^{3+}, nous n'avons noté aucune transformation

---

(*) Le choix du métal a été fait le plus souvent en fonction de son pouvoir activateur vis-à-vis de l'enzyme naturel de référence.

(**) Dans les milieux correspondant à la réaction arginasique, nous avons mis en évidence des traces d'urée qui en réalité proviennent simplement du séjour des AAN dans l'eau, comme nous l'avons noté plus haut.

TABLEAU XII

Essais de catalyse de réactions biochimiques par les acides azulmiques noirs. Les co-catalyseurs figurent en caractères soulignés.

Enzyme mimé		Milieu réactionnel complet — Concentrations finales/ml	pH	Durée de la réaction en minutes	Méthode pour suivre la réaction.
Catalase		H_2O_2 0,2 m eq. AAN 1 mg $\underline{FeCl_3}$ 3,3 µmoles K_2HPO_4 83 µmoles	ajusté à 6,8 avec HCl	15	Dosage de H_2O_2 par $KMnO_4$ avant et après la réaction
Adénase		Adénine 5 µmoles AAN 1 mg Tampon phosphaté de Soerensen 1/30 mmole	7,0	60	Chromatographie sur papier (solvant = eau distillée) avec témoin d'hypoxanthine
Transaminase	1er essai	Ac. glutamique 50 µmoles Pyruvate de sodium 50 µmoles AAN 1 mg $\underline{AlCl_3}$ 2 µmoles	3,8	60	Chromatographie sur papier (solvant : n-butanol pyridine-eau) avec témoin d'alanine
	2e essai	Urée 50 µmoles Ac. α-cétoglutarique 50 µmoles AAN 1 mg $\underline{AlCl_3}$ 2 µmoles	1,6	120	Idem mais avec témoin d'acide glutamique
Phosphatase	1er essai	β-glycérophosphate de sodium 18 µmoles AAN 1 mg $\underline{MgCl_2}$ 2 µmoles	8,1	60	Dosage de PO_4H_3 par le réactif molybdique
	2e essai	idem mais avec un tampon de diéthyl-barbiturate de sodium 3,8 mg	ajusté à 5,0 avec CH_3COOH	60	

TABLEAU XII (suite)

Arginase	1er essai	L-arginine 25 µmoles AAN 1 mg $MnSO_4$ 2 µmoles Glycocolle 50 µmoles	ajusté à 9,5 avec CH_3COOH	60	Dosage de l'urée libérée (92)
	2e essai	idem mais avec $COCl_2$ au lieu de $MnSO_4$ 2 µmoles	idem	180	
Glucose déshydrogénase		D-glucose 20 µmoles AAN 1 mg $MgCl_2$ 2 µmoles	7,5	360	Chromatographie sur papier (solvant : isopropanol, eau : 4:1, v/v) avec témoin d'ac. glucuronique et de xylose.
Estérase		p-nitro-phényl-acétate 2 µmoles AAN 1 mg Tampon phosphaté de Soerensen 1/15 mmoles	6,2	240	Dosage du p-nitro phénol par absorption de la lumière U.V.
ATP-ase	1er essai	ATP (sel disodique) 8,5 µmoles AAN 1 mg $CuCl_2$ 1 µmole glycocolle 85 µmoles NaCl 85 µmoles NaOH 15 µmoles	9,2	360	Dosage de PO_4H_3 par le réactif molybdique
	2e essai	ATP (sel disodique) 8,5 µmoles AAN 2 mg $CuCl_2$ 10 µmoles CH_3COOH 0,2 mmole NaOH 0,14 mmole	5,0	180	idem
Oxalo-acétate décarboxylase	1er essai	Acide oxalo-acétique 3 µmoles AAN 1 mg $MgCl_2$ (ou $MnSO_4$) 3 µmoles CH_3COOH 0,2 mmole NaOH 0,14 mmole	5,0	60	Mesure du volume de CO_2 libéré, avec l'appareil de Warburg
	2e essai	Acide oxalo-acétique 20 µmoles AAN 1 mg $NiCl_2$ 2 µmoles CH_3COOH 0,2 mmole NaOH 0,14 mmole	5,0	30	Chromatographie sur papier (solvant : n-butanol, ac. formique, eau 18:1:4, v/v) avec témoins de pyruvate et d'oxalo-acétate
Pyruvate décarboxylase		Pyruvate de sodium 10 µmoles AAN 2 mg $MgCl_2$ 3 µmoles	6,9	40	idem

des substrats,les AAN étant présents ou non.Tous ces résultats sont également valables lorsque le donneur du groupement $-NH_2$ est l'acide glutamique ou l'urée.

Pour trois réactions nous avons mis en évidence une activité catalytique des AAN:hydrolyse du p-nitro-phénylacétate,hydrolyse de l'ATP,décarboxylation de l'acide oxalo-acétique.

a)Hydrolyse du p-nitro-phénylacétate.

En quatre heures,la quantité de p-nitro-phénol libéré par le substrat est de 0,322 µmoles/ml par hydrolyse spontanée et de 0,416 µmoles/ml en présence d'AAN;par conséquent,en excluant l'hydrolyse spontanée,les AAN sont responsables d'un rendement de 4,7p.100.

b)Hydrolyse de l'ATP.

Certains ions divalents sont susceptibles d'accélérer l'hydrolyse spontanée de l'ATP (129);c'est le cas des ions Cu^{2+} que nous avons choisis comme co-catalyseurs.

A pH=9,2 et en six heures (tableau XII,ATP-ase:1er essai), en excluant l'hydrolyse spontanée les AAN sont responsables d'un rendement d'hydrolyse de 5p.100,les ions Cu^{2+} d'un rendement de 1p.100 et les ions Cu^{2+} en présence d'AAN d'un rendement de 3,7p.100.

A pH=5,0 et en trois heures (tableau XII,ATP-ase:2ème essai),en excluant l'hydrolyse spontanée,les AAN sont responsables d'un rendement de 3,3p.100,les ions Cu^{2+} d'un rendement de 9,9p.100 et Cu^{2+} en présence d'AAN d'un rendement de 8,2p.100.

Ces résultats montrent que l'activité catalytique des ions Cu^{2+} et celle des AAN ne s'additionnent pas;on note au contraire un effet défavorable de l'association des deux catalyseurs.

c)Décarboxylation de l'acide oxalo-acétique.

Certains cations divalents sont capables d'accélérer la décarboxylation spontanée de l'acide oxalo-acétique;il en est ainsi des ions Ni^{2+} et,à un degré moindre,des ions Mg^{2+}(125); d'autre part BESSMAN et LAYNE (11) ont montré que,à pH=5,0,la décarboxylation de l'acide oxalo-acétique est accélérée par les

amino-acides, en particulier par la glycine, l'histidine et la lysine qui précisément sont libérés au cours de l'hydrolyse acide des AAN; en présence d'ions métalliques, eux-mêmes activateurs de la décarboxylation, les activités catalytiques s'ajoutent dans le cas du couple glycine-Mn^{2+} et se contrarient dans le cas du couple histidine -Ni^{2+}(11); enfin les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} constituent les co-facteurs les plus fréquents des oxalo-acétate décarboxylases naturelles (125,134).

Nous avons choisi $NiCl_2$, $MgCl_2$ ou $MnSO_4$ comme sels métalliques. La décarboxylation de l'acide oxalo-acétique a été mise en évidence par deux méthodes différentes: d'une part la mesure manométrique du CO_2 dégagé à l'aide de l'appareil de Warburg, d'autre part la mise en évidence de l'acide pyruvique par chromatographie sur papier.

α) Etude manométrique.

L'acide oxalo-acétique (Calbiochem, A grade) a été dosé dans une fiole de Warburg d'après le volume de CO_2 libéré (134, 11) par action de $NiCl_2$ (à la concentration finale de 30 µmoles/ml).

Avec les conditions expérimentales rapportées dans le tableau XII (oxaloacétate décarboxylase: 1er essai), les réactions de décarboxylation (*) de l'ac. oxalo-acétique sont sensiblement du premier ordre; leur constante de vitesse est $K_1 = \frac{2,3}{t} \log \frac{C_o}{C}$ (**), constante pour laquelle nous avons trouvé les valeurs moyennes mentionnées dans le tableau XIII.

Tableau XIII

Décarboxylation de l'acide oxalo-acétique.

	Décarboxylation spontanée	Décarboxylation en présence de catalyseurs.				
		AAN	$MgCl_2$	AAN et $MgCl_2$	$MnSO_4$	AAN et $MnSO_4$
K_1, min^{-1}	0,006	0,013	0,020	0,031	0,034	0,045

(*) Nous avons vérifié que le gaz dégagé est bien du CO_2 et qu'il ne provient pas de la décomposition des AAN eux-mêmes.

(**) t est exprimé en minutes; les concentrations en ac. oxalo-acétique sont C_o au temps zéro et C au temps t; K_1 est exprimé en $minute^{-1}$.

Les AAN accélèrent donc la décarboxylation ;l'activité catalytique des ions Mg^{2+} ou Mn^{2+} et celle des AAN s'additionnent assez exactement.

β) Etude chromatographique.

Après séparation de l'acide oxalo-acétique et de son produit de décarboxylation en ω ,l'acide pyruvique,ces composés ont été dosés par chromatographie sur papier rendue quantitative selon la technique décrite par MAGASANIK et UMBARGER (75,132)(tableau XII,oxalo-acétate décarboxylase:2ème essai) En excluant la décarboxylation spontanée,les AAN sont responsables d'un rendement de 9p.100,les ions Ni^{2+} d'un rendement de 19,5 p.100 et les ions Ni^{2+} en présence d'AAN d'un rendement de 25p.100.

Notons cependant que,pour des estimations quantitatives, cette technique chromatographique comporte des causes d'erreurs plus importantes que la méthode manométrique,en particulier du fait que la décarboxylation de l'acide oxalo-acétique se poursuit au cours de la migration sur les chromatogrammes.

3.Discussion et conclusions.

Les AAN ne semblent pas catalyser l'hydrolyse du β-glycérophosphate ou de l'arginine ,ni la désamination de l'adénine.

La décomposition de l'eau oxygénée ne paraît pas accélérée par les AAN;on aurait pu s'attendre à ce que ces substances, insolubles dans le milieu expérimental,exercent une catalyse de surface comme cela a été montré par SIEGEL (121) dans le cas de composés minéraux naturels non poreux vis-à-vis de la réaction de décomposition de H_2O_2.BERNAL (10)estime que la catalyse de surface ,par les argiles en particulier,a pu jouer un rôle important dans l'évolution moléculaire pré-biologique mais il faut insister sur le fait que les argiles ont une structure de surface différente de celle des AAN pulvérisés;nous reviendrons sur cet aspect .

Nous pouvons confronter les propriétés catalytiques des protéinoïdes de FOX avec celles des AAN.Certaines réactions

biochimiques susceptibles d'être catalysées par les protéinoïdes ne le sont pas par les AAN :il en est ainsi des réactions de transamination (56),de la transformation du D-glucose en acide glucuronique puis en CO_2 et pentose (32),de la décarboxylation de l'acide pyruvique (57).

Par contre ,les trois réactions pour lesquelles nous avons trouvé une activité catalytique des AAN peuvent être accélérées aussi par les protéinoïdes:

-l'hydrolyse de l'ATP est accélérée par les protéinoïdes riches en acides aminés dicarboxyliques et en présence d'ions Zn^{2+}(28,21);

-l'hydrolyse du p-nitro-phénylacétate est accélérée principalement par les protéinoïdes contenant de l'histidine(114);

-la décarboxylation de l'acide oxalo-acétique est accélérée par les protéinoïdes riches en lysine (112,113).AAN et protéinoïdes riches en lysine pourraient donc être considérés comme des catalyseurs organiques à activité de décarboxylase; d'ailleurs LANGENBECK (66) a montré que de nombreux composés organiques aminés sont des catalyseurs particulièrement actifs pour la réaction de décarboxylation des acides cétoniques.

Pour la décarboxylation enzymatique de l'acide oxalo-acétique,un mécanisme a été proposé par STEINBERGER et WESTHEIMER (127):la protéine apo-enzymatique favoriserait la formation d'un complexe entre le métal divalent et le substrat,complexe qui perdrait facilement le CO_2 en ω ,non engagé dans une liaison avec l'ion métallique;si l'on accepte ce mécanisme,les AAN seraient donc susceptibles de jouer un rôle analogue à celui de la protéine.Néanmoins,les protéines apo-enzymatiques naturelles sont capables d'exacerber les propriétés catalytiques des co-facteurs métalliques;une activation aussi importante n'est pas retrouvée pour les AAN vis-à-vis des ions métalliques étudiés ici.

Il reste cependant plausible que les acides azulmiques noirs ont pu jouer un rôle de proto-enzymes à la surface de la Terre primitive:OPARIN suggère en effet que certaines macromolécules d'origine abiotique possédaient des activités catalytiques

faibles et peu spécifiques,mais progressivement leurs activités se sont renforcées et sont devenues plus étroitement spécifiques au cours de l'Evolution.

Conclusions du chapitre premier.

Les acides azulmiques noirs,substances très peu solubles dans l'eau et les solvants organiques classiques,peuvent être dissous dans le diméthylsulfoxyde,propriété qui nous a permis de mettre au point un dosage spectrophotométrique et de tenter une étude chromatographique et électrophorétique.

Les acides azulmiques noirs libèrent de faibles quantités d'amino-acides naturels au cours de leur hydrolyse chimique mais cette propriété ne semble pas en relation avec une structure polypeptidique; en effet,leur spectre infra-rouge ne montre aucune bande correspondant à la liaison peptidique et les enzymes protéolytiques classiques ne libèrent pas d'amino-acides après 24 heures de contact à 37°C avec les acides azulmiques noirs.

Les acides azulmiques noirs peuvent servir de source de carbone et d'azote pour certains champignons filamenteux.

Les acides azulmiques noirs sont susceptibles de catalyser certaines réactions biochimiques ,en particulier la décarboxylation de l'acide oxalo-acétique.

x

x x

CHAPITRE II

LES ACIDES AZULMIQUES DU SURNAGEANT.

Au cours de nos expériences nous nous sommes aperçu qu'après élimination du précipité d'AAN ,soit par centrifugation, soit par filtration sur filtre de porosité G_3,le liquide clair renfermait encore des corpuscules en suspension.Bien plus,avec le temps, la taille et le nombre de ces corpuscules,que nous avons dénommés "microsphérules",augmentait sensiblement.

I.Les microsphérules.

Les microsphérules,dont nous allons décrire la préparation à partir du cyanure d'ammonium,ressemblent morphologiquement aus "microsphères" décrites par FOX(31)au cours de la dégradation thermique des amino-acides,ainsi qu'aux micro-organites "Jeewanu"de BAHADUR (6,7)(*)préparés par photosynthèse ou encore aux sphérules obtenues par GROSSENBACHER et KNIGHT (41)en répétant les premières expériences de MILLER.Cependant,dès 1942, HERRERA (46)a décrit sous le nom de "sulphobes"des aspects pseudo-cellulaires très curieux obtenus en abandonnant à température ordinaire une solution aqueuse contenant du formol et du thiocyanate d'ammonium;ces expériences ont été confirmées par SMITH et coll.(123) en 1968.

Nous avons montré que l'hydrolyse chlorhydrique de nos microsphérules libère les mêmes composés d'intérêt biologique que celle des AAN.

A) Préparation et étude morphologique.

Nous avons sélectionné les conditions suivantes:

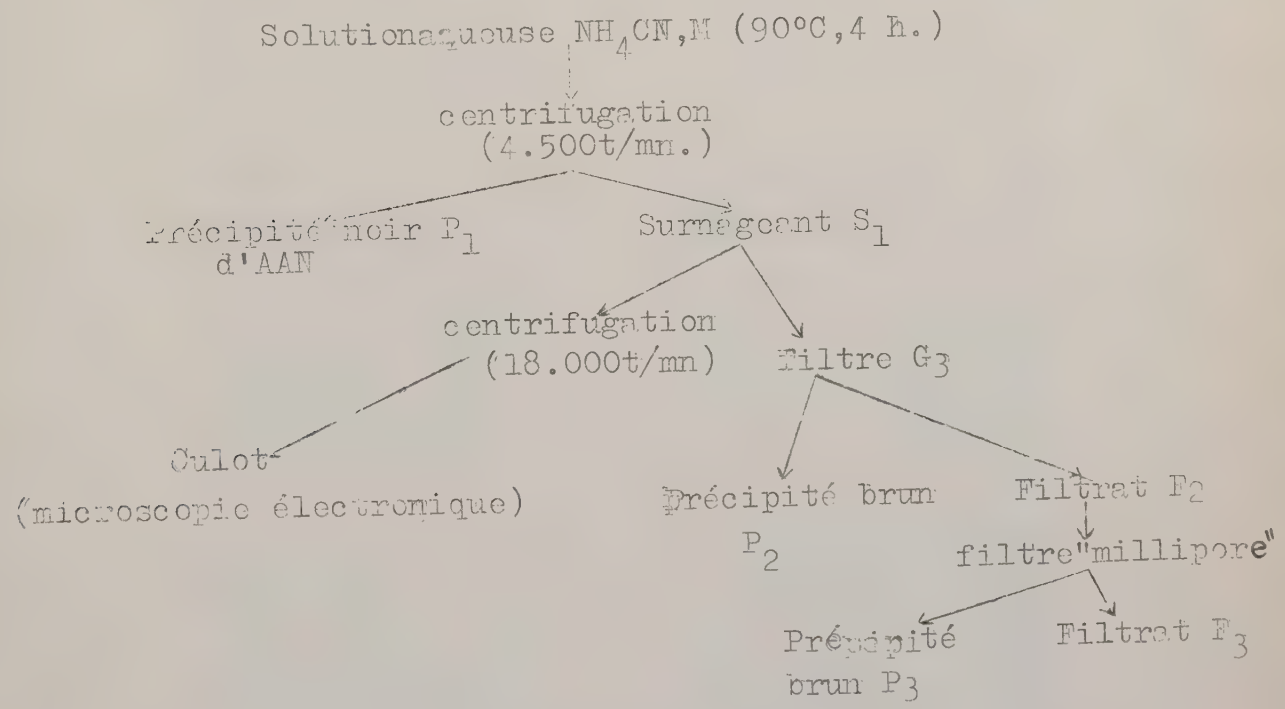
200ml d'une solution aqueuse molaire de NH_4CN sont chauffés à 90°C pendant 24 heures sous agitation.Après un séjour de 2 Fours en glacière à+4°C,on réalise les diverses opérations de fractionnement ,schématisées dans le tableau XIV.

(*) Jeewanu signifie en sanscrit:particules de vie.

On élimine d'abord par centrifugation à 4.500t/mn le précipité noir P_1 d'AAN.

Tableau XIV.

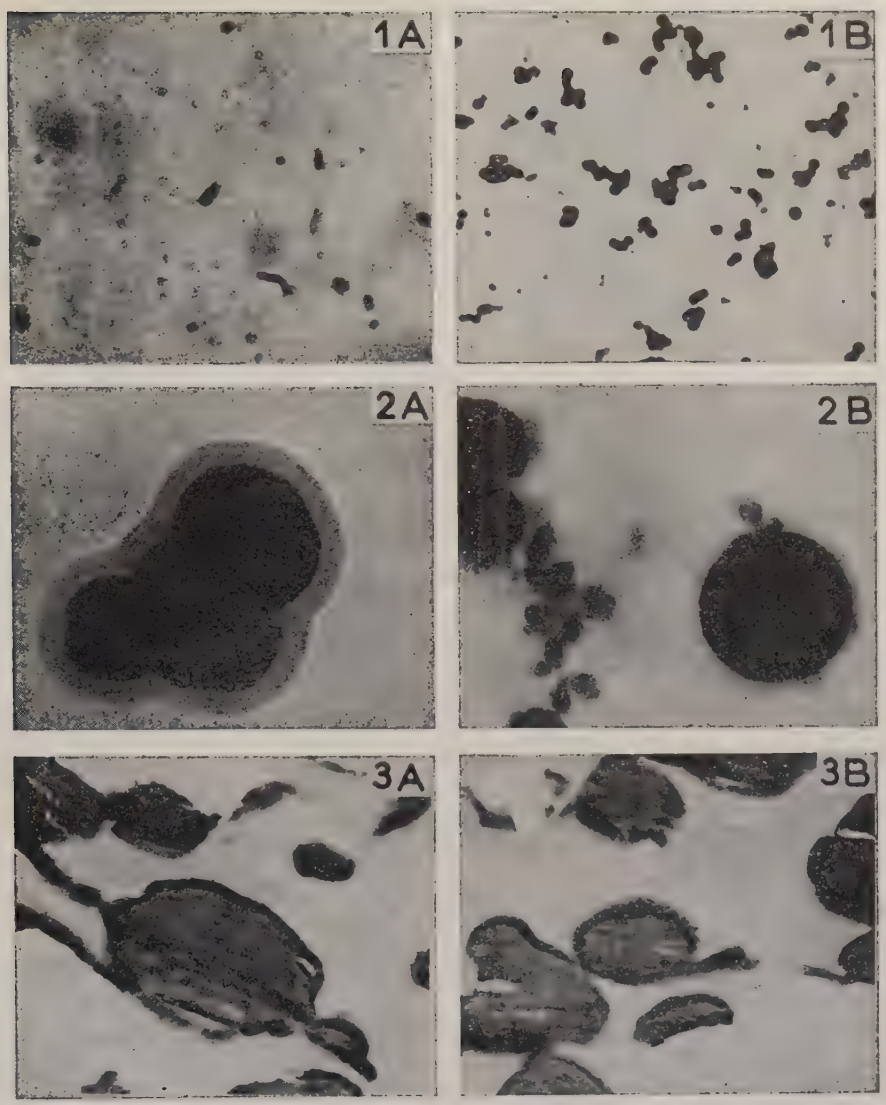
Fractionnement d'une solution aqueuse de NH_4CN, après chauffage.



1°) Etude au microscope photonique.

On recueille le surnageant S_1 brun orangé qui renferme une fine suspension de particules: en effet, une goutte examinée entre lame et lamelle permet d'apercevoir au microscope photonique un grand nombre de sphérules jaunâtres (fig. 5_{1A}).

Après dessiccation d'une goutte de surnageant S_1 sur lame, on voit, à l'immersion (fig. 5_{1B}), des sphérules brun jaunâtre dont la taille varie entre 0,1µ et 10 à 15µ, rassemblées en grappes ou parfois en chaînettes, ou encore isolées, offrant un aspect de bactéries coccacées; parfois on observe des amas arrondis mûriformes. Certaines de ces microsphérules présentent un aspect



Figures 5

1A et 1B -Photographies de microsphérules:
1A: au sein du surnageant x 800
1B: après simple dessication et examen à l'immersion x 900

2A et 2B- Micrographies de microsphérules obtenues au microscope électronique après inclusion initiale du surnageant dans la gélose (2Ax250.000;2Bx116.000)

3A et 3B -Micrographies de microsphérules desséchées obtenues au microscope électronique après inclusion directe dans la résine Epon x 24.800.

bourgeonnant. Seules les plus petites d'entre elles sont légèrement colorables par le vert de lissamine, l'amido-schwarz ou la coloration de Gram qui leur donne une teinte pâle rose-violacé. Nous avons obtenu une faible coloration violette des microsphérules par la ninhydine avec la technique suivante: après simple séchage de la préparation nous recouvrons la lame porte-objets d'une solution aqueuse contenant 0,5p.100 de ninhydrine et un tampon phosphaté $\frac{M}{75}$ de pH=6,8, puis nous chauffons à l'étuve à 110°C pendant 20 minutes; signalons également que nous avons obtenu un résultat négatif avec la réaction du biuret, effectuée sur lame aussi bien que sur le surnageant en tube (le réactif détériore fortement les microsphérules).

Le surnageant S_1, filtré sur verre fritté de porosité G_3 permet de recueillir un léger précipité P_2 brun qui, une fois lavé à l'eau distillée glacée, puis séché, pèse 18 mg. Le filtrat F_2, à nouveau examiné au microscope, montre encore la présence de nombreuses sphérules de taille moyenne ou petite très souvent disposées en chaînettes; enfin ce filtrat F_2 est passé au travers d'un filtre "millipore" GSWP (diamètre des pores 0,22µ) qui retient un nouveau précipité P_3 brun, lequel lavé et séché pèse 28mg; le dernier filtrat F_3 ne contient plus que quelques sphérules très petites, à la limite de la visibilité.

Cette double filtration nous permet donc de recueillir sur le filtre "millipore" des sphérules de taille assez homogène et d'éliminer par la première filtration quelques grains du précipité noir P_1 qui auraient pu accidentellement se détacher du culot de centrifugation.

Signalons qu'après quelques heures de séjour en glacière, de nouvelles microsphérules apparaissent dans le filtrat F_3, le diamètre de ces particules néo-formées pouvant atteindre 10 à 15 µ; à la surface de certaines de ces grosses microsphérules, on remarque plusieurs petits granules, ce qui donne des images semblables à celles qui ont été décrites par BAHADUR et coll. (2).

2°)Etude au microscope électronique.

Nous avons d'abord inclus le culot de centrifugation(18000t/mn)du surnageant S_1 dans la gélose à 2p.100 pour réaliser ensuite une fixation par le tetroxyde d'osmium à 1p.100 dans un tampon phosphaté selon MILLONIG(83),puis une imprégnation dans la résine Epon par la technique de LUFT(73).

Les coupes ultra-fines sont effectuées sur un ultramicrotome Servall-Porter Blum avec des couteaux de verre .L'examen des préparations au microscope électronique O.P.L. a montré la présence de petites sphères denses,limitées par une zone moins opaque aux électrons(fig.5_{2A} et5_{2B}),parfois bourgeonnantes.

Cependant le diamètre maximum des particules ainsi observées après nos premiers essais d'inclusion dans la gélose ne correspondait jamais à des objets de diamètre supérieur à 0,1-0,7µ En ces conditions le microscope électronique ne permettait donc plus de repérer les sphérules primitivement observables au microscope optique et il fallut donc admettre que celles -ci avaient subi un changement de structure(dissolution partielle,éclatement) du fait de leur type d'inclusion.

Nous n'avons pu éliminer cet artéfact dû à la gélose en apportant les modifications suivantes:

-soit élimination du temps de fixation par le tétroxyde d'osmium;les images sont alors aussi contrastées que précédemment ;

-soit inclusion initiale dans la gélose préparée dans une solution de NaCl à 1p.100 et utilisée à 45°C.

Nous nous sommes alors adressé à des microsphérules d'abord isolées sur filtre millipore,lavées à l'eau glacée,puis desséchées à température ambiante;ce matériel sec P_3 a été ensuite inclus directement dans l'Epon sans fixation par le tétroxyde d'osmium.Nous avons ainsi pu observer des images de taille correspondant à celle observée au microscope optique(fig. 5_{3A}et 5_{3B})et d'aspects assez différents de ceux qui sont visibles sur les figures 5_{2A} et 5_{2B}.Il s'agit alors ici de vésicules entourées d'une membrane plus dense que leur contenu,dont

l'aspect lamellaire pourrait être dû à une mauvaise pénétration de l'Epon dans ce matériel trop déshydraté;ces microphotographies sont assez semblables à celles qui ont été publiées par FOX(26).

B-Propriétés physico-chimiques des microsphérules.

Les microsphérules présentent les mêmes caractères de solubilité que les AAN.

Nos essais de remise en suspension des microsphérules desséchées après isolement sur filtre "millipore" ont été sans résultat,aussi bien dans l'eau distillée que dans des solutions aqueuses de NaCl à 1p.100 de pH variable(pH=3,5 à8,9).Les microsphérules ne semblent donc en suspension stable que dans leur milieu originel.

Les microsphérules ici décrites apparaissent au cours du refroidissement d'une solution aqueuse mère, par insolubilisation de polymères;les microsphères de FOX se forment dans des circonstances semblables;cependant la forme de nos microsphérules est braucoup plus rigide que celle des microsphères de FOX,aussi bien à l'état hydraté dans leur milieu originel qu'à l'état desséché :en effet,une modification de pH de ce milieu (*)contenant nos microsphérules n'entraîne pas les changements de forme décrits par FOX(27),d'autre part des essais successifs de déshydratation et de réhydratation des microsphérules par des tampons de Mc Ilvaine de pH=8 ou de pH=6 ne nous ont permis d'observer aucune des images en gouttes de coacervats décrites par SMITH et BELLWARE (122).

La stabilité de nos microsphérules semble liée à leur très faible solubilité dans l'eau.

C-Analyse chimique des microsphérules de la fraction P_3.

Le précipité P_3(28 mg),contenant 34,38 p.100 d'N total,est hydrolysé par HCl,6N(ébullition à reflux pendant 24 heures);à l'issue de cette hydrolyse ,il reste encore un précipité noirâtre qui correspond à 42,8p.100 du poids de P_3;ce précipité est éliminé par filtration et le filtrat est évaporé à sec:on obtient ainsi un résidu brun pesant 35mg.Ce résidu brun est

(*)Il est à l'origine égal à 10.

dissous dans 10ml d'eau distillée à chaud(4,5mg restent insolubles),puis cette solution est passée sur la résine Dowex-2 qui permet de séparer:

a) une fraction non retenue,riche en ions NH_4^+, qui,après évaporation à sec,fournit un résidu jaune pâle pesant 2,2mg;après dissolution dans 2ml d'eau distillée ,cette fraction est soumise à la chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman 3MM en utilisant deux couples de phases solvantes:Bu-Ac pour la première direction,puis Bu-P pour la seconde direction ,ou bien Mc-F puis Bu-E;nous avons ainsi identifié (tableau XV) la guanidine,la glycocyamine et l'urée;de plus sur les chromatogrammes il existe une tache M_1,visible en lumière ultra-violette,qui correspond à l'AICAI;la quantité totale d'AICAI libérée par l'hydrolyse de 28mg de P_3 a été évaluée à 0,15 µmoles.

b)un éluat par HCl,N (*) qui, évaporé à sec fournit un résidu brun clair pesant 11,5mg;ce dernier est à nouveau dissous dans 5ml d'eau distillée à chaud (0,9 mg reste insoluble).Sur cette dernière solution ,nous pratiquons une chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman 3MM(pour la première direction phase solvante Bu-Ac et pour la deuxième direction phase solvante Ph-Am ou bien phase Bu-P).La revélation à la ninhydrine fait apparaître 7 taches dont les R_f,répertoriés dans le tableau XV, correspondent aux amino-acides suivants:glycine,alanine,ac.aspartique,lysine,sérine,thréonine,histidine;la tache correspondant à la glycine est de loin la plus importante;signalons également la présence sur nos chromatogrammes d'une tache m_1 visible en lumière ultra-violette(λ=254 mµ).Le liquide d'élution de cette tache présente un maximum d'absorption à λ= 257 mµ(dans HCl 0,1N) et deux maxima à λ=260 et 287 mµ(dans NaOH 0,1N).Cette tache est colorable en orangé par le réactif de Pauly;tous ces caractères permettent d'affirmer que la tache m_1 est identique à la tache T décrite à propos de l'hydrolyse chlorhydrique des AAN.

(*)Après élution par HCl,N il reste encore une zone brune fixée sur la résine;nous n'avons pu éluer cette troisième fraction.

TABLEAU XV

Chromatographie sur papier de l'hydrolysat des microsphérules: Rf des différentes taches.

	Bu-Ac	Ph-Am	Bu-P	E	Me-F	Bu-E
Guanidine	0,39		0,48		0,70	0,25
Glycocyamine	0,37		0,34		0,70	0,13
Urée	0,47		0,53	0,86	0,65	0,22
Glycine	0,23	0,44	0,26			
Alanine	0,35	0,65	0,35			
Ac. Aspartique	0,22	0,19	0,15			
Lysine	0,17	0,71	0,16			
Sérine	0,18		0,33			
Thréonine	0,28		0,33			
Histidine	0,16		0,20			
Tache M1	0,40		0,52		0,62	0,16
Tache m1				0,76		0,25

Sur la même solution nous avons également réalisé le dosage de N total, celui de N aminé ainsi que la détermination quantitative de la glycine. Nous avons enfin soumis cette solution à l'analyse chromatographique sur résine Dowex-50. Les résultats apportés par cette dernière technique ont confirmé ceux obtenus par la chromatographie sur papier, en particulier en ce qui concerne la richesse relative en glycine (tableau XVI).

TABLEAU XVI

Substances identifiées par chromatographie sur résine Dowex-50(*) et dosées dans l'éluat chlorhydrique de l'hydrolysat des microsphérules.

(résultats exprimés : en µ atomes-gramme pour les deux premiers
en µ moles pour les autres)

Substances	Résultats pour la totalité de l'éluat HCl
N total	100
N aminé	33,75
NH_4^+	14
Glycine	16
Histidine	0,66
Acide aspartique	0,48
Alanine	0,50
Acide γ-amino butyrique	1,02
Thréonine	0,06
Sérine	0,06
Lysine	0,07
Ornithine	0,02
Acide glutamique	traces

(*)Trois composés ninhydrine positifs supplémentaires n'ont pu être identifiés ; l'un est élué de l'auto-analyseur avant l'acide aspartique et les deux autres sont élués à la fin, après l'histidine.

Comme ces résultats l'indiquent,les polymères qui entrent dans la constitution des microsphérules libèrent au cours de leur hydrolyse acide plusieurs amino-acides,comme d'ailleurs le précipité noir P_1 d'AAN.Le mode d'union de ces amino-acides dans le polymère constitue un problème d'intérêt majeur.Les essais que nous avons réalisés rendent improbable l'existence d'un enchaînement peptidique.En effet,le spectre d'absorption infra-rouge des fractions P_1 etP_3,s'il possède d'une manière très nette une bande à 1640cm^{-1} correspondant à une liaison C=O,ne montre aucune bande absolument caractéristique de la liaison peptidique (fig.6)(*).

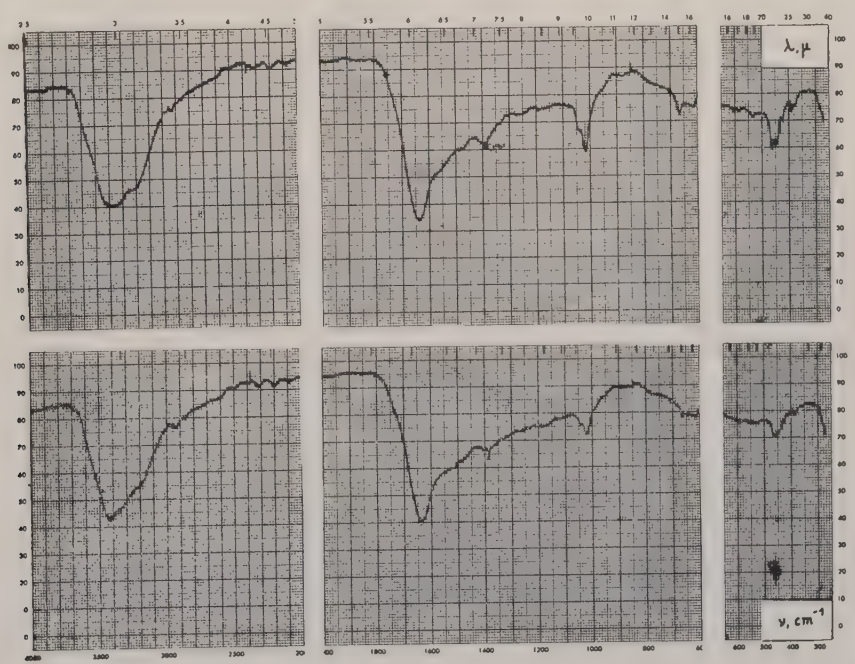


Fig.6-Spectres I.R.(inclusion dans KBr):en haut microsphérules P_3, en bas précipité noir P_1 d'AAN.

(*)Nous remercions vivement M.LASCOMBES qui a effectué ces spectres I.R.

Remarquons en outre la similitude presque complète des spectres infra-rouges du polymère noir P_1 et des microsphérules P_3.

Il semble donc que les polymères constitutifs de P_3 et P_1 sont de nature chimique très voisine et qu'ils ne renferment pas de liaisons peptidiques (ce dernier point est encore confirmé par le fait que la réaction du biuret est négative, comme nous l'avons mentionné plus haut).

Conclusion

Les microsphérules que nous avons décrites ont des aspects morphologiques rappelant ceux des bactéries coccacées ainsi que ceux des microsphères de FOX ou des "Jeewanu" de BAHADUR .

Depuis les publications de NAGY et coll. en 1961 (86,17), une controverse est ouverte sur l'origine des corpuscules microscopiques ovales ou arrondis, semblables à des spores, découverts dans les météorites carbonacées du type de celle qui tomba en France, à Orgueil, en 1864. De cette forme et de leur analyse montrant la présence de molécules organiques d'ordre biologique, ces auteurs tirent des arguments en faveur d'une origine biogène de ces chondrites qui pourraient ainsi apporter la preuve de l'existence de la vie sur d'autres planètes que la Terre; il est cependant aussi plausible de leur envisager un mode de formation purement chimique, abiogène, si l'on tient compte du fait que les microsphérules qui prennent naissance à partir du cyanure d'ammonium (*) ont des formes analogues et sont elles aussi composées de molécules d'intérêt biologique.

Nos microsphérules paraissent constituées d'acides azulmiques qui s'insolubilisent progressivement au sein de leur milieu d'origine.

D'après leur mode de formation, d'après leur aspect

(*) Les radicaux =NH et -CN semblent très répandus dans l'univers en particulier ils entrent dans la constitution des comètes (18, 94).

morphologique et d'après leur constitution chimique,nos microsphérules pourraient être considérées comme des modèles pré-cellulaires.

II. Les acides azulmiques dissous dans le surnageant.

Les acides azulmiques dissous dans la phase liquide du surnageant correspondent à une grosse tache brune qui migre peu sur les chromatogrammes(Fig.3).Nous avons également signalé plus haut que le poids global des acides azulmiques présents dans 100ml de surnageant après une nuit en glacière,pouvait être évalué à 0,57g,parmi lesquels 25 mg environ reviennent aux microsphérules:on peut donc estimer que le poids des acides azulmiques dissous dans le surnageant est d'environ 0,55g.

Lorsque, après évaporation à sec du surnageant,on essaie de reprendre le résidu par l'eau chaude ,on n'arrive à redissoudre environ que la moitié des acides azulmiques présents. On peut en conclure que les acides azulmiques dissous dans le surnageant voient leur structure se modifier progressivement, peut-être par augmentation de leur degré de polymérisation,pour devenir très peu solubles dans l'eau comme les AAN.

Signalons également que LOWE et coll.(72) ont réussi à séparer les acides azulmiques dissous dans le surnageant en plusieurs fractions;après évaporation du surnageant à sec,ces auteurs reprennent le résidu par l'eau chaude et la partie soluble dans l'eau est passée sur une résine sulfonique (IR 120,forme H^+): par simple élution par l'eau on élue 2fractions d'acides azulmiques, I et II(*);chacune est ensuite purifiée séparément sur Sephadex G 25 en utilisant l'eau comme phase solvante.Chaque fraction purifiée I et II est ensuite évaporée à sec et soumise à une électrophorèse sur papier (tampon pyridine-acide acétique ,pH=6,5):chaque fraction donne plusieurs bandes;par exemple, la fraction I forme trois bandes radioactives distinctes.Chaque

(*)Chaque fraction est détectée par radioactivité:en effet le milieu réactionnel initial(NH_4CN)est additionné de 40 uc de cyanure marquée par ^{14}C;ce traceur semblerait s'incorporer en partie dans les acides azulmiques.

bande est enfin eluée,puis hydrolysée par HCl,6N à la suite de quoi les amino-acides libérés sont analysés.LOWE et coll.ont trouvé pour chaque bande une forte prédominance en glycine et les deux amino-acides les plus abondants sont ensuite l'alanine et l'ac.aspartique;cette composition en acides aminés rappelle d'ailleurs celle des AAN.

Conclusions du chapitre II.

Les acides azulmiques apparus dans le surnageant,par polymérisation du cyanure d'ammonium sous l'action de la chaleur se trouvent en grande partie à l'état dissous dans la phase aqueuse refroidie.

Ces polymères bruns s'insolubilisent progressivement sous la forme d'une suspension de microsphérules;ces particules augmentent peu à peu de taille et s'agrègent entre elles,puis se sédimentent pour aller grossir le précipité d'acides azulmiques noirs.

Il semble que ces diverses catégories d'acides azulmiques aient une composition chimique assez semblable bien que leur solubilité dans l'eau diminue progressivement.

CHAPITRE III

STRUCTURE DES ACIDES AZULMIQUES OBTENUS A PARTIR DU CYANURE D'AMMONIUM.

Les acides azulmiques qui se forment par action de la chaleur sur une solution aqueuse de cyanure d'ammonium ont une structure encore peu connue.Nous rappellerons les hypothèses proposées pour expliquer la formation et la structure de ces polymères; leur structure sera discutée en fonction de diverses propriétés physico-chimiques observées au cours de nos travaux éxpérimentaux.

I.Mécanisme de formation et structure des acides azulmiques obtenus à partir du cyanure d'ammonium.

La découverte des acides azulmiques par PROUST (111), au cours du vieillissement d'une solution aqueuse d'acide cyanhydrique est décrite en ces termes dans les Annales de chimie de 1806:"L'acide prussique dissous dans l'eau et bien bouché ,s'y décompose de lui-même.Il se colore en jaune au bout de quatre à cinq mois.Il perd peu à peu son odeur,se trouble,et dépose un sédiment couleur de café qui,après avoir été chauffé,présente tous les caractères du charbon".GAY-LUSSAC en 1815 (36) voit dans ce"charbon" un "azoture de carbone". BOULLAY (13) qui crée le terme "acide azulmique" en 1830, découvre dans ce composé la présence d'hydrogène et montre que "l'acide azulmique résulte non seulement de la décomposition spontanée de l'acide hydrocyanique mais de celles de l'hydro-

cyanate d'ammoniaque ,du cyanogène dissous dans l'eau,de la réaction de ce genre sur les bases;en un mot,on le rencontre à tous les pas lorsqu'on s'occupe des composés du cyanogène".

En 1869 GAUTIER (35),dans une étude générale sur les nitriles,consacre un chapitre entier aux "acides polycyanhydriques", dans lequel nous remarquons l'énoncé des propriétés suivantes.

1°.Les acides azulmiques (ou azulmines) se forment spontanément à partir du formonitrile(HCN)à condition que de l'eau (*)et des traces d'ammoniaque ou d'un alcali soient présentes.

2°."Quand l'acide azulmique est récent,qu'il dégage encore de l'ammoniaque,sa polymérisation est moins avancée et il est toujours en partie soluble;s'il est très ancien et complètement transformé ,il n'est plus soluble dans l'eau pure mais seulement partiellement dans l'eau alcalinisée".

3°.L'acide azulmique est un polymère de HCN mais il contient en plus de l'oxygène dont on ne peut expliquer la présence que par l'intervention de l'eau.

4°.Pour GAUTIER la formule de l'acide azulmique la plus probable serait $(HCN)_9O_3$,qui correspondrait donc à une masse moléculaire de 291.

x

x x

Il y a une dizaine d'années,VÖLKER (136,137)a fait une importante mise au point sur les acides azulmiques préparés aussi bien en milieu anhydre qu'en présence d'eau.Signalons immédiatementqu'en l'absence d'eau les acides azulmiques obtenus par VÖLKER ne renferment pas d'oxygène et qu'ils ont pour formule brute $(HCN)_n$ (**).Nous rapporterons avec plus de détails

---

(*)On a montré par la suite que la présence d'eau n'est pas du tout indispensable.

(**)VÖLKER a observé que l'incorporation de l'oxygène gazeux ne se produit pas et n'influence pas la synthèse des acides azulmiques.

les conclusions de cet auteur concernant le mécanisme de formation et la structure des acides azulmiques préparés en milieu aqueux et plus particulièrement à partir de l'acide cyanhydrique en présence d'ammoniaque;remarquons cependant que les conditions de formation des acides azulmiques étudiées par VOLKER ne sont pas identiques à celles que nous avons choisies: en effet VOLKER opère avec un gros excès de HCN par rapport à NH_4OH.

1°-Composition centésimale ,masse moléculaire et formule brute des acides azulmiques préparés par VOLKER.

Après avoir chauffé entre 40°C et 50°C pendant 5 heures,à reflux,3,9g d'une solution aqueuse de NH_4OH(à 20 p.100)avec 200g d'une solution aqueuse de HCN(à30 p.100),VOLKER obtient un echantillon n°1 d'AAN (rendement :51 p.100)dont la composition centésimale est :C=40,2;N=41,8;H=3,8;O=14,2.La formule brute serait $C_{15}H_{17}O_4N_{13}$ correspondant à une masse moléculaire de 443(*).

L'échantillon n°3 d'AAN est préparé dans les mêmes conditions que précédemment mais avec une quantité légèrement supérieure de NH_4OH (5,4g au lieu de 3,9g);rendement:63 p.100; composition centésimale:C=41,4;N=42,3;H=4,1;O=12,9; formule brute:$C_{17}H_{19}O_4N_{15}$; masse moléculaire :497 (*).

Nous remarquons que les AAN que nous avons obtenus à partir de quantités stœchiométriques de HCN et NH_4OH ont une composition centésimale moyenne assez peu différente des deux précédentes(cf.deuxième partie,chapître I).

Nous ne proposons de notre côté aucune formule brute ni aucune masse moléculaire pour nos AAN.

Cependant,en tenant compte de nos résultats de dosage polarographique des groupements $-NH_2$ libresnous devrions admettre qu'un groupement $-NH_2$ libre correspond à 1550g de nos AAN;la masse moléculaire maximum de nos AAN serait donc égale à 1550, en admettant que la molécule ne renferme qu'un seul groupement aminé libre.

(*)VOLKER ne donne aucune indication sur la méthode choisie pour mesurer ces masses moléculaires.

2°) Mécanisme de formation et structure des acides azulmiques d'après VÖLKER.

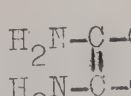
Pour expliquer le mécanisme de formation et la structure des acides azulmiques, VÖLKER a dû choisir entre deux modes fondamentaux de polymérisation de l'acide cyanhydrique; en effet, les travaux antérieurs ont montré que HCN peut se polymériser en donnant d'emblée soit des composés à liaison C–N, soit des composés à liaison C–C.

Le premier mode de polymérisation donne principalement naissance à un trimère, la mélamine (II) qui en fait est un trimère de la cyanamide (I).

I II

VÖLKER n'a pas retenu cette voie, passant par la synthèse du noyau 1,3,5-triazine, pour expliquer la formation des acides azulmiques; en effet la synthèse triazinique est plutôt favorisée en présence d'acide chlorhydrique.

Le deuxième mode de polymérisation de HCN est retenu par VÖLKER pour expliquer la transformation azulmique car cette polymérisation est induite par les bases. Ce type de polymérisation a été principalement étudié à propos de la formation d'un tétramère de l'acide cyanhydrique: le dinitrile de l'acide diaminomaléique (III):



III

composé qui peut d'ailleurs à son tour se transformer en acides azulmiques.

a) Le tétramère de l'acide cyanhydrique.

Ce composé est facilement obtenu par polymérisation spontanée de HCN en milieu basique, mais pour l'isoler il impor-

te de le séparer des nombreux autres composés formés, en particulier de la masse brunâtre des acides azulmiques. Le tétramère de HCN a été isolé à l'état cristallisé pour la première fois sous la forme de cristaux jaunâtres, en 1873 par LANGE (65); WIPPERMANN (142) établit qu'il s'agit bien d'un polymère de HCN, mais seulement d'un trimère; cet auteur montra que ce composé s'hydrolyse en milieu alcalin aqueux pour donner de la glycine, de l'ammoniaque et de l'acide carbonique. BEDEL (9) a montré en 1923 que le composé isolé par LANGE est en fait un tétramère de HCN de masse moléculaire égale à 110; BEDEL a isolé ce composé après une extraction par l'éther chaud d'un magma d'acides azulmiques, suivie d'une purification sur noir animal et de recristallisations dans l'eau froide: il a obtenu ainsi des cristaux faiblement colorés en jaune qui fondent en se décomposant à 179°C; ces cristaux sont "beaucoup moins toxiques que HCN"; ils sont assez peu solubles dans l'eau froide mais la solution aqueuse "s'altère au bout de quelques heures en donnant un précipité floconneux brun" (ceci montre la transformation azulmique). En 1928, GRYSZKIEWICZ-TROCHIMOWSKI (42) a proposé la structure du diaminomaléonitrile (III) pour le composé isolé par BEDEL.

En 1937 LINSTEAD et coll. (68) ont publié une préparation du tétramère en milieu anhydre: la polymérisation de HCN sec se produit spontanément à 20°C en présence de triéthylamine; au bout de quelques heures, du magma solide d'acides azulmiques, on extrait le tétramère par l'alcool isopropylique chaud; après plusieurs recristallisations dans cet alcool, les auteurs obtiennent des cristaux presque incolores qui fondent en se décomposant à 185-186°C.

Au cours de ces dernières années la formation et la structure du tétramère de HCN ont été précisées:

-WEBB et coll. (141) estiment que, d'après ses propriétés physico-chimiques, le tétramère préparé par LINSTEAD a bien

la structure du diaminomaléonitrile à l'état cristallisé ainsi qu'en solution diluée dans les solvants neutres.Ceci est confirmé par LONG et GEORGE (70),mais en solution dans le dioxanne ces auteurs pensent que le tétramère pourrait se présenter sous la forme d'un mélange de structures cis et trans.

-SANCHEZ et coll.(117) ont publié une étude très interessante sur la polymérisation de HCN en milieu aqueux dilué (0,01M à 0,005M),en présence d'ammoniaque et dans une gamme de températures comprises entre 25°C et -22°C.SANCHEZ a constaté que la formation du tétramère est favorisée par les basses températures; il a montré qu'à -22°C cette synthèse est en réalité favorisée par l'apparition de cristaux de glace qui doivent amener des augmentations localisées de la concentration en HCN.D'autre part, à basse température,les réactions d'hydrolyse concurrentielles des réactions de polymérisation,seraient inhibées. D'après SANCHEZ la formation du tétramère se ferait en trois étapes (117)(fig.7):

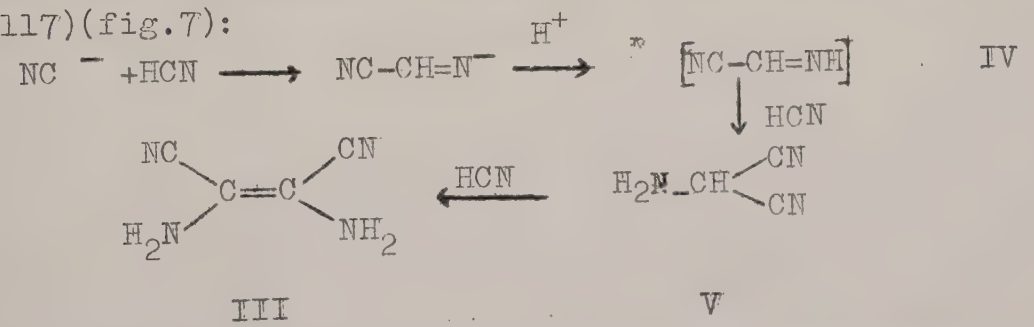


Fig.7-Mécanisme de formation du tétramère de HCN proposé par SANCHEZ et coll.

-d'abord formation hypothétique d'un dimère de HCN,l'iminoacétonitrile (IV);

-puis formation certaine d'un trimère de HCN,l'aminomalononitrile(V),par addition d'une troisième molécule de HCN;

-enfin addition d'une quatrième molécule de HCN sur l'aminomalononitrile pour obtenir le tétramère(III).

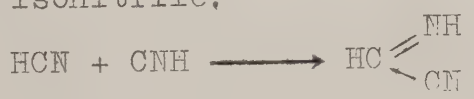
SANCHEZ et coll.ont remarqué en outre que ce tétramère

semble accélérer la formation des acides azulmiques lorsqu'on l'ajoute à une solution fraîche de HCN.

b)La théorie de VÖLKER.

Comme l'a montré GEOGHEGAN(37) dès 1836,la polymérisation azulmique est inhibée par les acides;au contraire elle est favorisée par des traces d'alcali (35).

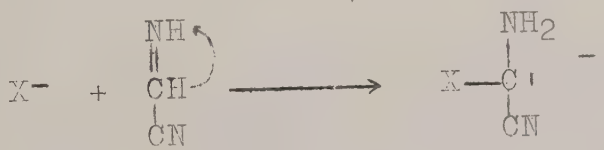
VÖLKER pense donc qu'il s'agit d'une polymérisation anionique et que l'unité qui construit le polymère est un dimère de HCN,l'iminoacétonitrile (IV);ce dimère se formerait par condensation entre les deux formes tautomères de HCN,la forme nitrile et la forme isonitrile:



IV

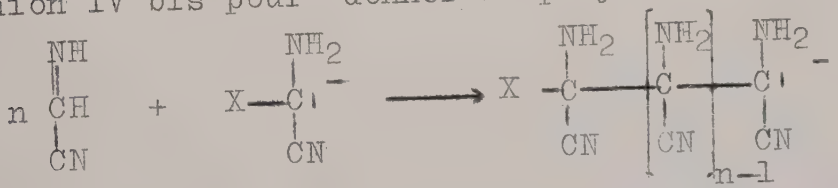
La polymérisation se déroulerait en trois étapes qui pourraient donner théoriquement naissance à un polymère de structure linéaire:

1.réaction de départ:fixation d'un anion X^- sur l'atome de carbone central de l'iminoacétonitrile (IV) pour donner un anion du dimère (IV bis);



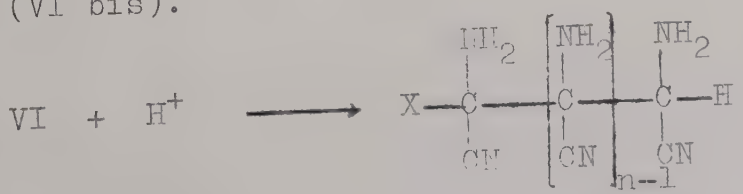
IV IV bis

2.réaction de propagation:fixation de n fois IV sur l'anion IV bis pour donner le polymère linéaire anion (VI).



VI

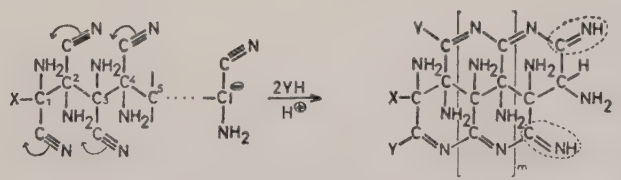
3.réaction d'arrêt:l'arrêt de la polymérisation en chaîne est opéré par un cation,H^+par exemple,qui donne le polymère linéaire (VI bis).



VI bis

Cependant un polymère du type VI bis ne peut pas avoir d'existance matérielle en raison de l'encombrement stérique apporté par cette succession de groupements nitriles.En se basant sur la formation des polyacrylonitriles,VÖLKER estime que le polymère VI doit se cycliser pendant la réaction de propagation;les cycles se formeraient par des réactions de condensation entre groupements nitriles par déplacements electroniques:

il se formerait ainsi deux séries de cycles à 6 sommets,chacune étant située de part et d'autre de la chaîne carbonée transversale du polymère,la première série étant formée aux dépens des groupements -CN portés par les carbones 1,3,5...,la deuxième série aux dépens des groupements -CN portés par les carbones 2,4,6...;on obtiendrait ainsi un polymère entièrement cyclisé (VII).



VI VII

Cette structure entièrement cyclisée est en accord avec le fait que le spectre I.R. des acides azulmiques formés en présence d'eau ne présente aucune bande caractéristique des groupements -C≡N (ceci est bien le cas de nos AAN);au contraire une bande nitrile intense,à λ =4,54 μ,est visible dans les spectres I.R.obtenus par VÖLKER.Pour les acides azulmiques préparés dans des conditions anhydres,VÖLKER admet que ces polymères ne renferment que la série de cycles formés aux dépens des groupements -CN portés par les atomes de carbone 1,3,5..;de plus ces polymères ne renferment pas

d'oxygène.

Enfin il reste à expliquer comment s'incorpore l'oxygène de l'eau dans les acides azulmiques préparés en milieu aqueux; VÖLKER envisage trois possibilités:

1. l'anion initiateur de la polymérisation peut être remplacé par un hydroxyle provenant éventuellement de la décomposition de l eau ($X^- = HO^-$);

2. au cours de la cyclisation, deux molécules d'eau peuvent être incorporées dans une molécule du polymère VII (YH=HOH);

3. les deux fonctions imines formées dans le polymère VII (entourées en pointillés sur la formule VII) peuvent être hydrolysées avec libération d'ammoniaque:

$$>C=NH \xrightarrow{HOH} >C=O + NH_3$$

cette formation de groupements >C=O explique alors la présence des bandes correspondantes trouvées dans les spectres d'AAN

La structure définitive proposée par VÖLKER pour les acides azulmiques préparés en milieu aqueux, c'est-à-dire pour les AAN, est visible dans la figure 8.

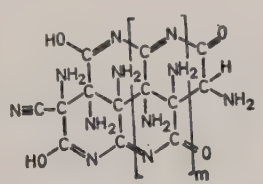


Fig 8—Structure des acides azulmiques noirs d'après VÖLKER. (m serait un nombre entier impair au moins égal à 7 et, dans cet exemple, l'anion initiateur $X^- = CN^-$).

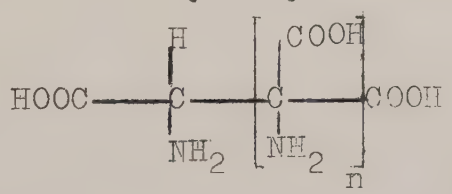
Nous pouvons remarquer que VÖLKER ne mentionne pas la formation du tétramère de HCN (III); en effet, s'appuyant sur des travaux de HUSEMANN (49) et de RUSKE et RUSKE (116), VÖLKER pense que la polymérisation de l'acide azulmique ne passe pas par la synthèse du tétramère(*).

(*) VÖLKER signale cependant que le tetramère peut se former par dimérisation du dimère IV.

En faveur de cette conception ,signalons que nous n'avons trouvé sur nos chromatogrammes aucune tache correspondant à ce composé.

II.Discussion.

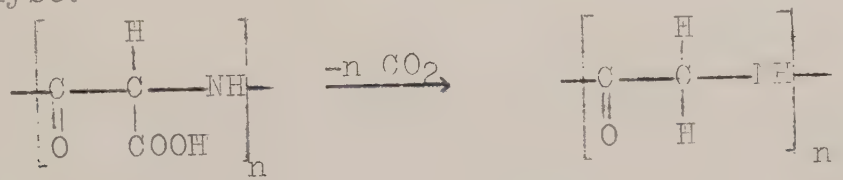
Peut-on admettre la structure polypyridinique proposée par VÖLKER (fig.8),structure dont l'axe transversal est constitué exclusivement par des liaisons C-C? Si cette structure est exacte on peut envisager qu'en solution dans le DMSO,les noyaux seraient responsables de l'absorption maximum à λ=252 mμ (*).Les résultats de l'hydrolyse des AAN par un acide ou une base rapportés dans un brevet anglais (84)seraient également conformes à la structure de la figure 8 puisque la chaîne carbonée se retrouverait dans des produits d'hydrolyse de formule générale:



Pour notre part,il nous est difficile d'interpréter la formation d'amino-acides ici décrite au cours de l'hydrolyse par $Ba(OH)_2$ et,à fortiori,par HCl.Si la structure proposée par VÖLKER est correcte nous devons admettre la possibilité de rupture de certaines liaisons C-C c'est-à dire une sorte de cracking qui,principalement en milieu chlorhydrique ,donnerait des radicaux libres susceptibles de se recombiner pour aboutir aux amino-acides et aux dérivés imidazoliques.Nos résultats expérimentaux sont assez semblables à ceux de LOWE et coll.(72) en ce qui concerne la nature et les proportions des amino-acides libérés par hydrolyse chlorhydrique d'AAN préparés dans des conditions peu différentes des nôtres.A l'intérieur des polymères nous avons montré en outre que les amino-acides ne semblent

(*)Nous avons vérifié que le spectre U.V. de la pyridine en solution dans le DMSO(cuve de 1mm d'épaisseur)présente ce même maximum,mais il existe en plus un maximum à λ=258 mμ .

pas liés par des liaisons peptidiques.Cette constatation ne nous permet pas non plus de retenir l'hypothèse de MATTHEWS et MOSER (79) selon laquelle les AAN préparés en présence d'eau seraient des peptides du type acide polyaminomalonique (a) qui pourraient se décarboxyler en poly-glycine (b) libérant de la glycine par hydrolyse:



a b

Signalons encore que le spectre de diffusion des rayons X par les AAN en poudre ,selon la méthode de Debye-Scherrer,nous a montré un anneau correspondant à une période de 3,28Å,spectre retrouvé identique dans la fraction apparemment non attaquée par l'hydrolyse chlorhydrique (*).Ce spectre est celui d'un composé amorphe et il ne peut témoigner que de la répétition d'un motif quelconque dans le polymère ;peut-être indiquerait-il que la distance entre des couches serait de 3,28Å ?(**).

Enfin,sans pouvoir encore l'établir sur des bases expérimentales,et rejoignant la proposition faite par GAUTIER dès 1869 (35), il nous semble que les acides azulmiques paraissent constituer un groupe très complexe de molécules dont le degré de polymérisation et par conséquent la solubilité dans l'eau,peuvent être très variables:en effet les acides azulmiques du surnageant,solubles dans l'eau,pourraient s'insolubiliser progressivement au fur et à mesure que leur degré de polymérisation augmente et acquérir ainsi les caractères des AAN.

(*)En solution dans le DMSO,cette fraction NI,présente encore le spectre U.V. caractéristique des AAN,de même que la fraction correspondante non attaquée après hydrolyse barytique.

(**)Nous remercions vivement Monsieur le professeur COLLETTER qui a effectué les spectres de diffusion des R.X.

A D D E N D U M

Dans le but d'identifier certaines taches retrouvées constamment sur nos chromatogrammes, en particulier celles qui sont visibles en lumière ultra-violette, nous avons étudié le comportement chromatographique et le spectre U.V. de nombreux composés (*).

Le spectre d'absorption de la lumière ultra-violette (220 à 400mμ) a été effectué en cuve de silice de 1cm d'épaisseur, aussi bien en solution dans HCl, 0,1N que dans NaOH 0,1N, la concentration de chaque substance étant généralement choisie entre 0,1 et 0,3 μ moles/ml de façon que la densité optique aux λ max soit comprise entre 0,5 et 1,5.

Nous avons effectué des chromatographies descendantes sur papier Whatman 3 MM; pour cela, chaque composé a été mis en solution d'une part dans l'eau et d'autre part dans HCl 0,2N (solutions à 10 μ moles/ml) puis 0,2 à 0,5 μ moles, selon les cas, ont été déposées sur les chromatogrammes.

Les chromatogrammes ont été examinés en lumière visible (v) et ultra-violette (U.V.) à λ = 254 mμ, puis révélés par divers réactifs: Pauly (P), diacétyle (D), Ehrlich (E), ferricyanure-nitroprussiate (F), Millon (M), Pan et Dutcher (P et D)(103), Wood (W)(143) $AgNO_3$ ammoniacal (Ag).

En raison de la richesse de nos chromatogrammes en taches révélables par le réactif de Pauly, nous avons étudié d'abord une série de dérivés imidazoliques (tableau XVII).

Parmi ceux-ci, nous avons préparé le guanidino-4-imidazole (fig.9) par hydrolyse chlorhydrique de la guanine (Calbiochem, A

(*) Nous remercions vivement MM. SANCHEZ et KUMASHIRO qui nous ont offert gracieusement certains produits.

TABLEAU XVII

Dérivés de l'imidazole

(les Rf correspondant aux solutions chlorhydriques sont soulignés d'un trait)

Composés (origine)	Spectre U.V. λ max, mμ HCl 0,1N	Spectre U.V. λ max, mμ NaOH 0,1N	Chromatographie sur papier Rf E	Me-F	Bu-E	Bu-P	Bu-Ac	Révélation
Imidazole (Merck-Darmstadt)		220	0,82 0,91	0,80 0,80	0,50 0,10 et 0,31			Rouge (P)
Acide urocanique (Roche)	267	220 287	0,91 0,58	0,73 0,73	0,28 0,28		0,55 0,43	Bleu violet (U.V.) Rouge (P) Bleu pâle (F)
Acide dihydro-urocanique (Calbiochem-Agrade)			0,95 0,95 et 0,56	0,83 0,83	0,05 0,17	0,42 0,42	0,54 0,45	Rouge (P) Violet pâle (F)
Acide imidazolyl-4-carboxylique (Koch-light pur)	218	232	0,91 0,91	0,72 0,72	0,07 0,07	0,034 0,034	0,032 0,032	jaune→orangé (P) bleu pâle (F)
Acide imidazolyl-4-acétique (Koch-light puriss)		220	0,93 0,93	0,77 0,77	0,04 0,04	0,034 0,034	0,041 0,041	Rouge (P) Violacé (F)
Acide imidazolyl-4-pyruvique (Calbiochem, Agrade)	282	307	0,96 0,96	0,69 0,69 et 0,44	0,02 0,02	0,31 0,31	0,16 0,16	Bleu (U.V.) Rouge (P) Violet (F)
Hydroxyméthyl-4-imidazole (Calbiochem)			0,47 0,47	0,80 0,80	0,21 0,21	0,73 0,73	0,43 0,43	Rouge (P) Gris-vert (F)
Amino-4-carbonitrile 5-imidazole (R.A. Sanchez)	228 252	220 253	0,77 0,72	0,74 0,74	0,52 0,32	0,80 0,80	0,65 0,45	Bleu violet (U.V.) Ocre (P) Vert→violet (F)
Dicyano-4,5-imidazole (Ajinomoto, Tokyo)	246	263	0,89 0,89	0,80 0,80	0,72 0,72	0,85 0,85	0,87 0,87	Bleu (U.V.) rose violacé (F)
Amino-4-carboxamide-5-imidazole (Mann, M.A.)	235 267	222 277	0,58 0,58	0,60 0,63	0,25 0,25	0,63	0,50 0,50	Bleu violet (U.V.) Bleu (P) Gris→violet (F) Jaune (E)
Guanidino-4-imidazole (préparé d'après Hunter (48))		220	0,11	0,67	0,17 0,17 et 0,08	0,65 et 0,56	0,44 0,26	Bleu-vert (D) Grenat→violet (P) Bleu-gris→violet (F)

TABLEAU XVIII

Dérivés benzéniques

(Les Rf correspondant aux solutions chlorhydriques sont soulignés d'un trait)

Composés (origine)	Spectre U.V. λ max, mμ HCl 0,1N	Spectre U.V. λ max, mμ NaOH 0,1N	Chromatographie sur papier Rf E	Me-F	Bu-E	Bu-Ac	Révélation
Acide o-Hydroxy-benzoïque (Prolabo,RP)	237 302	297	0,86 0,87	0,87 0,85	0,50 0,64	0,92 0,92	Bleu (U.V.) Jaune (P)
Acide m-Hydroxy-benzoïque(Fluka,puriss)	237 295	225 312	0,91 0,69	0,85 0,81	0,75 0,79	0,91 0,91	Bleu (U.V.) Orangé (P)
Acide p-Hydroxy-benzoïque (Fluka,purum)	255	280	0,91 0,62	0,83 0,81	0,79 0,82	0,91 0,90	Bleu-Violet (U.V.) Orangé (P)
Acide anthranilique (Fluka,puriss)	227 270	222 240 308	0,91 0,70	0,82 0,81	0,77 0,61	0,91 0,80	Jaune (V)Bleu (U.V.) Jaune (P)
Acide m-amino-benzoïque (Fluka,puriss)	227 270	222 300	0,92 0,69	0,79 0,79	0,43 0,43	0,81 0,54	Jaune (V)Bleu (U.V.) Jaune (P)
Acide p-amino-benzoïque (Fluka,purum)	227 270	225 265	0,90 0,58 et 0,88	0,80 0,79	0,70 0,52	0,86 0,47	Jaune (V) Violet (U.V.) Jaune (P)
Acide hydroxy-3-anthranilique (Laroche)	235 297	232 330	0,92 0,70	0,74 0,76	0,69 0,50	0,84 0,58 et 0,73	Jaune orangé (V) Bleu (U.V.) Orangé (P)
Acide vanillique (Fluka,purum)	260 292	225 297	0,90 0,58	0,86 0,84	0,74 0,75	0,90 0,88	Bleu-violet (U.V.) Rouge (P)
o-amino-phénol (Fluka, puriss)	270	220 243 295	0,73 et 0,07 0,32	0,85 et 0,65 0,76	0,80 0,42	0,74 et 0,79 0,54 et 0,63	Jaune (V) (Rose (U.V.) Grenat (P)
Acide o-hydroxy-phénylacétique (Fluka, purum)	270	238 292	0,93 0,81	0,85 0,82	0,70 0,72 et 0,96	0,92 0,91	Bleu-violet (U.V.) Grenat (P)
Acide m-hydroxy-phénylacétique (Aldrich)	273	220 238 292	0,94 0,94	0,86 0,86	0,67 0,70	0,90 0,90	Orangé (P) Rose (M)
Acide p-hydroxy-phénylacétique (Fluka, purum)	222 274	295	0,94 0,94	0,86 0,86	0,66 0,72	0,88 0,90	Violet (P) Rose (M)
L-tyrosine (Fluka, puriss)	227 275	245 292	0,85 0,85	0,80 0,80	0,07 0,13		Violet (U.V.) Orangé violacé (P)

TABLEAU XIX

Composés divers

Les Rf correspondant aux solutions chlorhydriques sont soulignés d'un trait)

Composés (origine)	Spectre U.V. λmax, mμ HCl 0,1N	Spectre U.V. λmax, mμ NaOH 0,1N	Chromatographie sur papier Rf E	Me-F	Bu-E	Bu-P	Bu-AC	Révélation
Adénine (Calbiochem Agrade)	263	222 268	0,36 0,22	0,55 0,55	0,37 0,19	0,64 0,61	0,59 0,46	Bleu-violet (U.V.) Bleu→jaune (F) Bleu (W)
Hypoxanthine (Roche)	247	222 263		0,45	0,20	0,63	0,32	Bleu-violet (U.V.) Bleu (W)
Triamino-4,5,6-Pyrimidine (Fluka, purum)	283	220 278	0,36 0,18	0,56 0,57	0,18 0,06		0,38 0,32	Bleu (U.V.) Bleu→violet (F)
Pyridine (Merck-Darmstadt)	257	245 252 258 263						Bleu (U.V.)
Mélamine (Fluka, purum)	235		0,25 0,25	0,45 0,45	0,06 0,06	0,35 0,35	0,37 0,37	Blanc sur fond marron (Ag) Jaune tardif (E)
Acide DL-uréido-succinique (Cyclo, grade I)		222	0,95 0,85	0,74 0,74	0,10 0,35		0,53 0,53	Bleu (P et D)
Acide DL-hydantoïne-5-acétique (Cyclo, grade I)		224	0,90 0,82	0,65 0,65	0,10 0,35		0,53 0,53	Bleu (P et D)
Diamino-maléonitrile (R.A. Sanchez)	292	295	0,78 0,78	0,79 0,79	0,72 0,72	0,93 0,93	0,80 0,80	Bleu-violet (U.V.) jaune-pâle (V) Jaune-pâle (P) Bleu→violet (F)

grade),selon une technique inspirée de celle de HUNTER (48).Le produit obtenu a été purifié d'abord sur résine Dowex-2,qui retient les impuretés,et obtenu chromatographiquement pur après élution des taches de guanidino-4-imidazole(révélables en bleu-vert par le réactif de Pauly)à partir de chromatogrammes effectués sur papier Whatman 3MM.

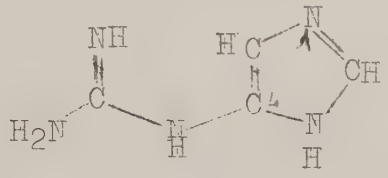


Fig.9- Guanidino-4-imidazole,d'après HUNTER(48).

Ensuite,pour essayer de déterminer certaines taches révélables sur nos chromatogrammes par le réactif de Millon,nous avons étudié une série de dérivés benzéniques parmi lesquels de nombreux composés à fonction phénolique (voir tableau XVIII).

Enfin,nous avons étudié un groupe de composés divers,parmi lesquels des dérivés puriques ou pyrimidiques,la pyridine,la mélamine,deux dérivés de l'urée et un nitrile(voir tableau XIX)

Aucune des substances répertoriées dans ces trois tableaux n'a pu être retrouvée dans le surnageant ou dans les hydrolysats divers.

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

Une solution aqueuse de cyanure d'ammonium permet de recréer au laboratoire un échantillon de l'océan primitif tel que le proposent les théories modernes de l'origine de la vie sur la Terre. Nous avons étudié dans ce travail les transformations subies par une solution aqueuse de cyanure d'ammonium, principalement sous la simple influence de la chaleur; nous nous sommes attaché à mettre en évidence la nature et le mécanisme de formation des composés organiques multiples ainsi obtenus, parmi lesquels tout particulièrement les composés d'intérêt biologique. Ces résultats expérimentaux sont interprétés dans le cadre de l'évolution moléculaire pré-biologique dont l'océan primitif a pu être le siège.

x

x x

Une solution aqueuse molaire de cyanure d'ammonium, de pH égal à 9,58, est chauffée à 90°C pendant quatre heures; le précipité noir et le surnageant brun orangé obtenus par filtration du milieu réactionnel refroidi sont étudiés séparément.

I. Le précipité noir

Ce précipité est constitué par des acides azulmiques, substances quaternaires, riches en azote et en carbone, dont la nature polymérique a été reconnue il y a cent ans.

L'hydrolyse chlorhydrique des acides azulmiques noirs libère, en faibles quantités, plusieurs composés d'intérêt biologique; nous avons identifié l'urée, la guanidine, la glycocyamine, un précurseur immédiat de l'adénine: l'amino-4-carboxamidine-5-imidazole, ainsi que neuf acides aminés naturels. Parmi ces amino-

acides,la glycine prédomine nettement et on trouve en outre,par ordre d'abondance décroissante:l'acide γ-amino-butyrique ,l'acide aspartique,l'alanine,l'histidine,la thréonine,la sérine,la lysine et l'ornithine.Les acides azulmiques ne semblent cependant pas renfermer de liaisons peptidiques puisque la trypsine,la pepsine ,la papaïne et la pronase sont sans action sur ces polymères; de plus,le spectre infra-rouge des acides azulmiques en poudre ne montre d'une manière nette que la bande à 1640cm^{-1} correspondant à la liaison C=O.

Aucun DNP-amino-acide n'est libéré par l'hydrolyse chlorhydrique à laquelle nous avons soumis les acides azulmiques noirs à l'issue de 48 heures de contact avec le dinitrofluorobenzène.

Les acides azulmiques noirs constituent une source de carbone et d'azote utilisable par certains champignons inférieurs appartenant au genre Pénicillium et au genre Aspergillus.

Les acides azulmiques noirs sont capables de catalyser certaines réactions biochimiques ,principalement la décarboxylation de l'acide oxalo-acétique et ,à un degré moindre ,l'hydrolyse de l'ATP ou du para-nitro-phényl-acétate.

Le spectre de diffusion des rayons X des acides azulques noirs en poudre,qui nous montre un anneau correspondant à une période de 3,28 Å,pas plus que leurs propriétés chimiques paradoxales,ne permettent de confirmer la structure polypyridinique que VÖLKER a proposée pour ces polymères.

II.Le surnageant.

En plus des ions CN^- et NH_4^+ non transformés ,le surnageant renferme plus de trente composés organiques parmi lesquels nous avons identifié l'urée (en quantité relativement importante) la guanidine,la glycocyamine et une grande quantité d'acides azulmiques bruns.

Nous avons observé que les acides azulmiques en solution dans le surnageant s'insolubilisent progressivement sous la forme de"microsphérules" morphologiquement assez semblables à

des bactéries coccacées ou encore à certaines inclusions découvertes depuis 1961 dans les météorites carbonacées.Des micrographies de ces microsphèrules nous ont montré,en microscopie électronique,des aspects comparables à ceux décrits par FOX pour ses protéinoïdes,préparés par thermo-condensation des acides aminés naturels;il s'agit en effet de vésicules bourgeonnantes limitées par une"membrane" plus opaque aux électrons que leur contenu;ces aspects évoquent une structure pseudo-cellulaire.

x

x x

Deux propositions essentielles se dégagent de notre travail.

1-A partir du cyanure d'ammonium,la synthèse d'amino-acides et de dérivés imidazoliques passe par l'intermédiaire des acides azulmiques qui libèrent secondairement par hydrolyse ces composés d'intérêt biologique.

2-Par leur mode de formation,par leurs produits de dégradation hydrolytique,par leur faculté de former des systèmes polymoléculaires morphologiquement définis et par leurs propriétés enzymatiques rudimentaires ,les acides azulmiques ont très bien pu constituer une des étapes fondamentales de l'évolution moléculaire pré-biologique.

-:-:-:-:-:-:-

B I B L I O G R A P H I E

1. ABELSON P.H., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1966, 55, 1365-1372.

2. ALEXANDER J., Science, 1942, 96, 252.

3. ALEXANDER B., LANDWEHR G. et SELIGMAN A.M., in BLOCK R.J. et BOLLING D., The amino-acide composition of protéines and foods, 1 vol., 576p., Ch. Thomas édit., Springfield, 1951.

4. ARRHENIUS S., L'évolution des mondes. La vie dans l'univers, 1 vol., 236 p., Paris, 1910.

5. BAHADUR K., Nature, 1954, 173, 1141.

6. BAHADUR K., Vijnana Parishad Anusandhan Patrika, 1963, 6, 63-117.

7. BAHADUR K., Synthesis of Jeewanu, the Protocell, 1 vol., 220 p., Ram Narain Lal Beni Prasad édit., Allahabad-2, India, 1966.

8. BAHADUR K. et coll., Z. Bakt., 1964, 117, 575-584.

9. BEDEL Ch., C.R. Acad. Sc., 1923, 176, 168-171.

10. BERNAL J.D., in Une discussion sur l'origine de la vie, 1 vol., 221 p., Publications de l'Union rationaliste, Paris, 1955.

11. BESSMAN S.P. et LAYNE E.C., Arch. Biochem. Biophys., 1950, 26, 25-32.

12. BISERTE G., HOLLEMAN J.W., HOLLEMAN-DELOVE J. et SAUTIERE P., J. chromatog. 1959, 2, 225-271.

13. BOULLAY P., Ann. Chim. Physique, 1830 (2), 43, 273-285.

14. BRIGGS M.H., Nature, 1961, 191, 1137-1140.

15. CAVALIERI L.F., TINKER J.F. et BROWN G.B., J.Am. chem.Soc., 1949, 71, 3973-3976.

16. CHAMPAGNAT A., brevet français N° 1,340,225 (1963), in Chem. Abstr., 1964, 60, 4748c.

17. CLAUS G. et NAGY B., Nature, 1961, 192, 594-596.

18. DAUVILLIER A., C.R. Acad. Sc., 1960, 250, 3925-3927.

19. DAUVILLIER A. et DESGUIN E., La genèse de la vie, phase de l'évolution géochimique, 1 vol., Hermann édit., Paris, 1942.

20. DEBRIS P., in LOISELEUR J., Techniques de laboratoire, 3 vol., Masson édit., Paris, 1963, t. II.

21. DURANT D.H. et FOX S.W., Federation Proc., 1966, 25, 342.

22. EGGERS V.G., brevet russe N° 42,061 (1935), in Chem.Abstr.,1936, 30,8048 (1).

23. ENGELS F., Dialectique de la Nature, 1 vol.,364 p., Editions sociales, Paris, 1961.

24. FLEURY P. et LOTH R., in FLEURY P., Techniques de chimie biologique, 1 vol., Véga édit., Paris, 1949.

25. FLORKIN M., L'origine de la vie; quelques aspects du problème, 1 vol., 268 p., Gauthier-Villars édit., Paris, 1962.

26. FOX S.W., Bio Sciences, 1964,14,13-21.

27. FOX S.W., Nature, 1965,205,328-340.

28. FOX S.W.,in FOX S.W., The origins of prebiological systems and of their molecular matrices, 1 vol., 482 p., Académic Press édit., New-York,1965.

29. FOX S.W., in Radiation Research., 1966, p.714-29, North-Holland Publishing Company, Amsterdam,1967.

30. FOX S.W. et HARADA K., J.Am. Chem.Soc.,1960,82,3745-3751.

31. FOX S.W., HARADA K. et KENDRICK J., Science, 1959,129,1221-1223.

32. FOX S.W. et KRAMPITZ G., Nature, 1964,203,1362-1364.

33. FUHS G.W., Arch. Mikrobiol., 1961,39,374-422.

34. GARRISON W.M., MORRISON D.C., HAMILTON J.G., BENSON A.A. et CALVIN M., Science, 1951,114,416-418.

35. GAUTIER A., Ann. Chim. Physique, 1869 (4), 17,103-260.

36. GAY-LUSSAC J.L., Ann. Chim.Physique, 1815 (1), 95,136-231.

37. GEOGHEGAN W., Ann. chem.,1836,18,68-70.

38. GOLDSCHMIDT V.M., New Biol., 1952,12,97-105.

39. GÖTZ F., brevet allemand N° 950.911 (1956), in Chem. Abstr., 1957,51,2216b.

40. GRABAR P., in LOISELEUR J., Techniques de laboratoire, 2 vol., Masson édit., Paris, 1954, t.I.

41. GROSSENBACHER K.A. et KNIGHT C.A., in FOX S.W., The origins of prebiological systems and of their molecular matrices, 1 vol., 482 p., Academic Press. édit., New-York, 1965.

42. GRYSZKIEWICZ-TROCHIMOWSKI, Rocz.chem., 1928,8,165.,in WEBB R.L. et coll.,J.Am.Chem.soc.,1955,77,3491-3493.

43. GUYE C.E., L'évolution physico-chimique, 1 vol., Chiron édit., Paris,1922.

44. HALDANE J.B.S., New-Biol., 1954, 16, 12-27, in Une discussion sur l'origine de la vie, 1 vol., 221 p., Publications de l'union rationaliste, Paris, 1955.

45. HARADA K. et FOX S.W., Nature, 1964, 201, 335-336.

46. HERRERA A.L., Science, 1942, 96, 14.

47. HODGSON G.W. et BAKER B.L., Nature, 1964, 202, 125-131.

48. HUNTER G., Biochem. J., 1936, 30, 1183-1188 et 1189-1201.

49. HUSTEDT H.H., Thèse, Marburg/L., 1957.

50. JENSEN R. et LAROUDE M.F., sous presse in Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.

51. JOSSELIN J., thèse doct. Pharm., Bordeaux 1961.

52. KAHANE E., Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 707-711.

53. KAUTTER C.T., brevet allemand N° 911018 (1952), in Chem.Zbl., 1954, 125, 9376.

54. KEOSIAN J., The origin of life, 1 vol., 118 p., Reinhold publishing Corporation, New-York, 1964.

55. KHARASCH N. et THYAGARAJAN B.S., Quarterly reports on sulfur Chemistry, 1966, 1, 16-29.

56. KRAMPITZ G., DIEHL S. et NAKASHIMA T., Naturwissenschaften, 1967, 54, 516-517.

57. KRAMPITZ G. et HARDEBECK H., Naturwissenschaften, 1966, 53, 81-82.

58. LABADIE M., sous presse in Bordeaux Médical.

59. LABADIE M., COHERE G. et BRECHENMACHER C., C.R. Soc. Biol., 1967, 161, 1689-1693.

60. LABADIE M., DUCASTAING S. et BRETON J.C., sous presse, in Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.

61. LABADIE M., DUCASTAING S. et NEUZIL E., sous presse in C.R. Soc. Biol.

62. LABADIE M., JENSEN R. et NEUZIL E., Bull. Soc. Chim.biol., 1967 49, 673-682.

63. LABADIE M., JENSEN R. et NEUZIL E., sous presse in Biochim. Biophys. Acta.

64. LANCE D., C.R. Acad. Sc., 1897, 124, 819-821.

65. LANGE O., Ber., 1873, 6, 99.

66. LANGENBECK W., Adv. in Enzymol., 1953, 14, 163-192.

67. LIEBIG J.V. et DENIGES G., in KOLTOFF I.M. et STENGER V.A., Volumetric Analysis, 3 vol., Interscience édit., New-York, 1947, t. II.

68. LINSTEAD R.P., NOBLE E.G. et WRIGHT J.M., J. Chem. Soc., 1937, 920 ; in WEBB et coll., J.Am. Chem. Soc., 1955, 77, 3491-3493.

69. LIPMAN C.B., Sci. Mon., 1924, 19, 357.

70. LONG D.A., GEORGE W.O. et WILLIAMS A.E., Proc. Chem. Soc., 1960, 285-286.

71. LOWE C.U. et REES M.W., Federation Proc., 1963, 22, part.I, 479.

72. LOWE C.U., REES M.W. et MARKHAM R., Nature, 1963, 199, 219-222.

73. LUFT J.H., J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 9, 409-414.

74. Mc KENNA E.J. et KALLIO R.E., Ann. Rev. Microbiol., 1965, 19, 183-208.

75. MAGASANIK B. et UMBARGER H.E., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2308-2309.

76. MARIANI E. et TORRACA G., Intern. Sugar. J., 1953, 55, 309-311.

77. MARKHAM R., Biochem. J., 1942, 36, 790-791.

78. MARKOVETZ A.J. et KALLIO R.E., J. Bacteriol, 1964, 87, 968-969.

79. MATTHEWS C.N. et MOSER R.E., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1966, 56, 1087-1094.

80. MILLER S.L., Science, 1953, 117, 528-529.

81. MILLER S.L., J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 2351-2361.

82. MILLER S.L., Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 480-489.

83. MILLONIG G., J. Appl. Physics, 1961, 32, 1637-1640.

84. Monsanto Chemical co, brevet anglais N° 845.363 (1960), in Chem. Abstr., 1961, 55, 5022f.

85. MUELLER G., Nature, 1964, 204, 567.

86. NAGY B., MEINSCHEIN W.G. et HENNESSY D.J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1961, 93, 27-35.

87. NEUZIL E., LABADIE M. et BRETON J.C., Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1966, 105, 20-40.

88. OPARIN A.I., Proiskhozhdenie zhizni, Moscou (Izd. Moskovskii Rabochi), 1924.

89. OPARIN A.I., Life. Its Nature, origin and development, 1 vol., 207 p. Oliver and Boyd, édit., Edinburgh, 1961.

90. OPARIN A.I., L'origine de la vie sur la Terre, 1 vol.,516 p., Masson édit., Paris,1965.

91. ORCEL J., Colloque sur les systèmes biologiques élémentaires et la biogénèse, Paris, 1965.

92. ORMSBY A.A., J. Biol.chem., 1942, 146,595-604.

93. ORO J., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1960, 2,407-412.

94. ORO J., Nature, 1961, 190,389-390.

95. ORO J.,Nature, 1961, 191,1193-1194.

96. ORO J., Fédération Proc., 1961, 20, part I,352.

97. ORO J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 108,464-481.

98. ORO J. et COX A.C., Fédération Proc., 1962,21,80.

99. ORO J. et KAMAT S.S., Nature, 1961, 190,442-443.

100. ORO J. et KIMBALL A.P., Arch. Biochem. Biophys.,1961,94,217-227.

101. ORO J. et KIMBALL A.P., Arch. Biochem. Biophys., 1962,96,293-313.

102. ORO J. et KIMBALL A., FRITZ R. et MASTER F., Arch. Biochem. Biophys., 1959,85,115-130.

103. PAN S.C. et DUTCHER J.D., Anal. Chem., 1956,28,836-838.

104. PETERS K. et KÜSTER H., Brennstoff Chem.,1931, 12,122-127.

105. PIRIE N.W., New Biol., 1954,16,41-53, in Une discussion sur l'origine de la vie, 1 vol., 221 p., Publications de l'Union rationaliste, Paris,1955.

106. PIRIE N.W., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1957, 69,369-376.

107. PIRIE N.W., Transactions of the Bose research Institute Calcutta, 1958, XXII, 111-120.

108. PONNAMPERUMA C. et MARINER R., Radiation Res., 1963, 19,183.

109. POUCHET F.A., Hétérogénie ou traité de la génération spontanée basé sur de nouvelles expériences, 1 vol., 672 p., Baillère et fils édit., Paris, 1859.

110. POWELL H.M., Nature, 1952, 170,155.

111. PROUST J.L., Ann. Chim. Physique, 1806 (1),60,225-252.

112. ROHLFING D.L., Fédération Proc., 1966, 25,524.

113. ROHLFING D.L., Arch. Biochem. Biophys., 1967, 118,468-474.

114. ROHLFING D.L., et FOX S.W., Arch. Biochem. Biophys.,1967, 118,122-126.

115. de ROSNAY J., Ann. chim., 1967, 2,57-79 et 133-148.

116. RUSKE W. et RUSKE E., Ber., 1958, 91,2496-2504.

117. SÁNCHEZ R., FERRIS J. et ORGEL L.E., Science, 1966, 153,72-73.

118. SÁNGER F., Biochem.J., 1945,39,507-515.

119. SEIFERT H., Z.Elektrochem., 1955,59,409-412.

120. SEIFERT H., Naturwissenschaften,1955,42,13.

121. SIEGEL S.M., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1957,43,811-816.

122. SMITH A.E. et BELLWARE F.T., Science, 1966,152,362-363.

123. SMITH A.E., SILVER J.J. et STEINMAN G., Experientia, 1968,24,36-38.

124. SMITH I., Chromatographic and electrophoretic techniques, 2 vol., W. Heinemann édit.,Londres, 1960, T.I.

125. SPECK J.F. , J. Biol.Chem., 1949,178,315-324.

126. SPENCER H., The principles of Biology, 1 vol., Williams and Norgate édit., Londres,1898.

127. STEINBERGER R. et WESTHEIMER F.H., J. Am. chem. Soc., 1951,73, 429-435.

128. SUSSMAN A.S. et HALVORSON H.O., Spores, Their dormancy and germination, 1 vol.,354 p., Harper et Row édit., New-York, 1966.

129. TETAS M. et LOWENSTEIN J.M., Biochemistry, 1963,2,350-357.

130. TROLL W. et CANNAN R.K., J. Biol. Chem., 1953,200,803-811.

131. TROMMSDORFF E. et GÖTZ F., brevet allemand N° 949.060 (1952), in Chem. Zbl., 1957, 128,13465.

132. UMBARGER H.E. et MAGASANIK B., J. Am.Chem. Soc., 1952,74,4253-4255.

133. VARNER J.E. et BURRELL R.C., Euclides, 1955,15,1-8.

134. VENNESLAND B., GOLLUB M.C. et SPECK J.F., J. Biol.Chem.,1949,178, 301-314.

135. VOGEL A.I., Practical organic chemistry, 1 vol.,1188p.,Spottoiswoode édit.,Londres, 1956.

136. VÖLKER Th., Angew. Chem., 1957,69,728-729.

137. VÖLKER Th., Angew. Chem., 1960,72,379-384.

138, VÖLKER Th., J.Less-common. Metals, 1961, 3, 262-263.

139, WAKAMATSU H., YAMADA Y., SAITO T., KUMASHIRO I et TAKENISHI T., J. Org. chem., 1966, 31, 2035-2036.

140. WALD G., Scientific american, 1954,45 .

141. WEBB R.L., FRANK S. et SCHNEIDER W.C., J. Am.Chem.Soc.,1955, 77,3491-3493 .

142. WIPPERMANN R., Ber.,1874,7,767-772.

143. WOOD T. in SMITH I. chromatographic and electrophoretic techniques, 2 vol., W. Heinemann édit., Londres, 1960, t.I .